



Macroalgas da Península Ibérica: Extração de compostos bioativos com atividade antibacteriana e antioxidante.

CARLA ALEXANDRA DOS SANTOS RODRIGUES

Julho de 2021

Macroalgae from the Iberian Peninsula: Extraction of bioactive compounds with antibacterial and antioxidant activity

Macroalgas da Península Ibérica: Extração de compostos bioativos com atividade antibacteriana e antioxidante

Carla Alexandra dos Santos Rodrigues

Dissertação submetida para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química,
ramo opcional Qualidade

Orientadoras: Professora Doutora Valentina Domingues

Co-orientadoras: Doutora Fátima Barroso
Engenheira Aurora Silva

Centro de investigação: GRAQ – Grupo de Reação e Análises Químicas e
REQUIMTE/LAQV

Julho de 2021

Dedico este trabalho a mim, pelo esforço e dedicação.

Agradecimentos

Com o final deste segundo grande objetivo da minha vida acadêmica, resta-me agradecer a todas as pessoas que me apoiaram, ouviram, ajudaram e elevaram a minha autoestima para fazer este trabalho, de que tanto me orgulho.

À Doutora Valentina Fernandes Domingues pela orientação, disponibilidade e amizade que nunca faltaram desde o início até à conclusão desta dissertação.

À Doutora Maria Fátima Barroso e à engenheira Aurora Silva, como sabem é pouco o que vou escrever aqui, tenho sorte de Deus me ter colocado com a vossa co-orientação, agradecer é tão pouco comparado com o que vocês fizeram por mim, são as pessoas mais bonitas que encontrei, apaixonantes, cativadoras, fortes e mágicas. Agradeço do fundo do meu coração por toda a amizade que nos juntou, a cumplicidade e o respeito mútuo, as nossas brincadeiras nas poucas horas que o permitiam. Um obrigado sincero pela força, pelas palavras, pela confiança e pela empatia durante o trabalho. Como disse, é pouco, muito pouco para dizer o quanto vocês marcaram a minha vida. Obrigada, muito obrigada.

À minha doce mãe, Minda, e meu doce pai, Nando, amar-vos é pouco. Vocês são a minha luz, a minha garra e a bolha que ninguém pode entrar. Vocês são a minha pessoa, são tudo de bom e tudo o que me orgulho. Obrigada por todos os esforços e por nunca deixarem de ser bons pais. Por esses belos ouvidos, que nunca me deixaram ficar mal e por essa bela boca, que me encorajou e apoiou todos os dias. Obrigada pelo orgulho que têm em mim. Obrigada por me terem ajudado a ser esta bela pessoa.

À minha bela irmã Ana e ao amor da minha vida Alice. São a minha perdição, a minha loucura e a minha paz. Obrigada, mana, por me teres mostrado o que é o amor incondicional, obrigada “isse” por seres o meu amor incondicional. É muito amor por ti mana e tu sabes. E tu Alice, a tita será sempre a tua sombra. Obrigada por estarem sempre do meu lado e nunca hesitarem em estar lá.

A mim, tenho de me agradecer muito por chegar onde cheguei. Pelo poço que me mostrou as estrelas, pelo ódio que me mostrou o amor e pela loucura que me mostrou a ciência. Agradeço-me por me ter tornado a boa mulher que sou, por nunca ter desistido de mim e por conseguir chegar à ternura, respeito e empatia que tenho pelos outros. Esta dissertação, acompanhou-me nesta mudança e na descoberta pelo meu “EU”. Espero que ao ler, consigam perceber a forte dedicação e o amor que tive na concretização deste trabalho. Um obrigado.

“Estamos todos no fundo do poço, mas alguns de nós ousam olhar para as estrelas. “

Oscar Wilde

Resumo

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a capacidade antioxidante e antimicrobiana de nove algas castanhas (*Ascophyllum nodosum*, *Himanthalia elongata*, *Undaria pinnatifida*, *Pelvetia canaliculata*, *Saccharina latíssima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Laminaria ochroleuca*, *Sargassum muticum* e *Fucus spiralis*), recolhidas na costa norte da Península Ibérica. Demonstrou-se que os vários extratos brutos das algas castanhas apresentam propriedades biológicas e químicas, nomeadamente atividade antimicrobiana e antioxidante. Neste trabalho, analisou-se o efeito de cinco solventes de extração (etanol, clorofórmio, hexano, acetona e acetato de etilo) no rendimento da extração, n conteúdo em compostos fenólicos e flavonoides, na capacidade antioxidante e na atividade antimicrobiana.

O conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante dos extratos brutos obtidos foram avaliados por diferentes métodos: conteúdo fenólico total (TPC), atividade de eliminação de radicais (DPPH[•]-RSA) e poder antioxidante redutor férrico (FRAP). Além disso, a atividade antimicrobiana de cada extrato foi estudada com seis microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Staphylococcus epidermidis* (NCTC 11047); *Bacillus cereus* (ATCC 14579); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145); *Salmonella enteritidis* (ATCC 13676) e *Escherichia coli* (NCTC 9001).

O maior rendimento de extração das macroalgas foi obtido quando o etanol foi usado como solvente extrator. Porém, quanto aos valores de TPC, DPPH[•]-RSA e FRAP, o acetato de etilo foi o solvente que possibilitou os maiores teores fenólicos e capacidades antioxidantes. No que diz respeito à capacidade antioxidante dos extratos das espécies das algas, os maiores valores de TPC e FRAP foram encontrados na espécie *Ascophyllum nodosum*, enquanto os maiores valores de DPPH[•]-RSA foram alcançados nos extratos de *Fucus spiralis*. As atividades antimicrobianas dos extratos de alga variaram em relação ao solvente utilizado, reforçando a ideia de que esta característica é dependente do solvente e deve ser otimizada para cada caso. *Saccharina latíssima* e *Bifurcaria bifurcata* foram as algas mais promissoras considerando o seu potencial como agentes antimicrobianos.

Palavras chave: Macroalgas, Algas castanhas, Conteúdo fenólico, Capacidade antioxidantes, Compostos bioativos, Atividade antimicrobiana.

Abstract

The main objective of the present work was to evaluate the antioxidant and antimicrobial capacity of nine brown algae, collected from the north coast of the Iberian Peninsula. It has been shown that crude and composite extracts of brown algae have useful properties, namely antimicrobial and antioxidant activity. In the present work, it was analyzed the effect of five different extraction solvents (ethanol, chloroform, hexane, acetone and ethyl acetate) on the extraction yield, phenolic content, antioxidant capacity and antimicrobial activity of nine species of brown macroalgae (*Ascophyllus nodosum*, *Himanthalia elongata*, *Undaria pinnatifida*, *Pelvetia canaliculata*, *Saccharina latissimus*, *Bifurcaria bifurcata*, *Laminaria ochroleuca*, *Sargassum muticum* and *Fucus spiralis*). The phenolic content and antioxidant capacity of the crude extracts were recovered by different methods: total phenolic content (TPC), radical scavenging activity (DPPH[•]-RSA) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). In addition, the antimicrobial activity of each extract was studied against six different microorganisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Staphylococcus epidermidis* (NCTC 11047); *Bacillus cereus* (ATCC 14579); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145); *Salmonella enteritidis* (ATCC 13676) and *Escherichia coli* (NCTC 9001).

The highest extraction yield was obtained when the ethanol was used as an extracting solvent. However, regarding the values of TPC, DPPH[•]-RSA and FRAP, ethyl acetate was the solvent that provided the greatest antioxidant capabilities. Regarding the composition of algae species, the highest values of TPC and FRAP were found in *Ascophyllus nodosum*, while the highest values of DPPH[•]-RSA were found in *Fucus spiralis*. The antimicrobial activities of algae extracts were variable regarding the solvent, reinforcing the idea that this characteristic is solvent dependent and must be optimized for each case. *Saccharina latissimi* and *Bifurcaria bifurcata* were the most promising algae, considering their potential as antimicrobial agents.

Keywords: Macroalgae, brown algae; phenolic content, Antioxidant capacity, Bioactive Compounds, Antimicrobial activity.

Índice

Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvi
Abreviaturas	xviii
1. Introdução	1
1.1. Macroalgas	2
1.1.1. Macroalgas Castanhas.....	5
1.2. Ecologia das macroalgas	9
1.3. Macroalgas Castanhas e suas aplicações.....	10
1.3.1. Indústria alimentar	11
1.3.1.1. Comestibilidade das macroalgas.....	13
1.3.2. Indústria farmacêutica e cosmética	14
1.4. Compostos Bioativos nas macroalgas castanhas.....	16
1.4.1. Polissacarídeos	17
1.4.2. Proteínas.....	18
1.4.3. Compostos Lipofílicos	18
1.4.4. Compostos Fenólicos	24
1.5. Extração dos compostos bioativos das macroalgas castanhas	29
1.5.1. Atividade antioxidante e antibacteriana.....	30
1.5.2. Avaliação da atividade antioxidante	31
1.6. Bactérias usadas no estudo da capacidade antimicrobiana das macroalgas castanhas	32
1.6.1. <i>Escherichia coli</i>	32
1.6.2. <i>Salmonella enteritidis</i>	33
1.6.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
1.6.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	33

1.6.5.	<i>Bacillus cereus</i>	34
1.6.6.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	34
2.	Objetivos	35
3.	Materiais e Métodos	36
3.1.	Preparação dos extratos de macroalgas	36
3.1.1.	Amostragem e preparação das amostras	36
3.1.2.	Extração sólido-líquido	36
3.2.	Análise Química e Biológica.....	37
3.2.1.	Avaliação do teor em compostos fenólicos e atividade antioxidante	37
3.2.6.	Avaliação da capacidade antimicrobiana.....	41
4.	Resultados e discussão	43
4.1.	Avaliação do teor em compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	43
4.1.1.	Determinação por TPC (Total phenolics content)	44
4.1.2.	Determinação TFC (Total flavonoids content)	46
4.1.3.	. Método DPPH-RSA (radical scavenging activity) e FRAP (Ferric reduction activity power).....	46
4.2.	Atividade antimicrobiana	52
5.	Conclusão	65
	Bibliografia	67
	Anexo A	78

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Algas: (a) microalgas, necessitam do uso de um microscópio para observação (Scenedesmus, Chlorophyta); (b) macroalgas são algas maiores, visíveis a olho nu, (Porphyra umbilicalis, Rhodophyta) [adaptado [4]].-----	2
Figura 1.2 - Percentagem da produção de algas marinhas cultivadas nos principais países do ranking mundial [Adaptado [2]].-----	4
Figura 1.3 - Espécies de macroalgas castanhas [Adaptado [10]].-----	6
Figura 1.4 - Mapa de ocorrência mundial de algas castanhas, as cores dos círculos representam a abundância das macroalgas castanhas, círculo vermelho escuro muito abundante, amarelo pouco abundante. [Adaptado [22]]-----	9
Figura 1.5 - Mapa de ocorrência da Península Ibérica de algas castanhas, as cores dos círculos representam a abundância das macroalgas castanhas, círculo vermelho escuro muito abundante, amarelo pouco abundante. [Adaptado[22]].-----	9
Figura 1.6 - Utilização mundial de macroalgas castanhas [adaptado [19]].-----	11
Figura 1.7 - Estrutura dos ácidos gordos, PUFAs, presentes nas macroalgas castanhas [adaptado [30]].-----	19
Figura 1.8 - Estrutura geral de um triacilglicerol (R1, R2, R3, são os radicais dos ácidos gordos) [adaptado[9]].-----	19
Figura 1.9 - Exemplos de glicerolípidos presentes nas macroalgas castanhas [adaptado [23]].-----	20
Figura 1.10 - Vias Mevalonato (MVA) e 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato/2-C-metil-D-eritritol-4- fosfato (DOXP/MEP). Abreviaturas da figura: HMG-CoA : 3-(S)-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, CDPME2P : 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato, ME-cPP : 2-C-metil-D-eritritol-2,4- ciclo-difosfato, HMBPP : 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato. [adaptado [50]].-----	21
Figura 1.11 - Estrutura química dos diterpenos identificados em algas castanhas do género Dictyota [adaptado [51]]-----	22
Figura 1.12 - Carotenóides e clorofilas existentes nas macroalgas castanhas [adaptado [5]].-----	23
Figura 1.13 - Esteróis encontrados em macroalgas castanhas [adaptado[52]].-----	24
Figura 1.14 - Via xiquimato e síntese de compostos fenólicos pela via fenilpropanóide [Adaptado [58]].-----	25

Figura 1.15 - Exemplos de ácidos e aldeídos fenólicos presentes em algas. [adaptado [57]].	26
Figura 1.16 - Esquema e estrutura base das diferentes subclasses de flavonóides [Adaptado[57]].	26
Figura 1.17 - Exemplo de flavonóis identificados em macroalgas castanhas [Adaptado [41]].	27
Figura 1.18 - Florotaninos isolados de macroalgas castanhas [Adaptado [37]].	28
Figura 1.19 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH e compostos antioxidantes. [adaptado [70]].	31
Figura 1.20 - Formação do complexo Fe^{2+} - TPTZ a partir do complexo Fe^{3+} - TPTZ por um antioxidante [Adaptado [70]].	32
Figura 3.1 - Evaporador REACTI-THERM III #TS-18823 e exemplo de um extrato seco.	36
Figura 3.2 - Leitor de microplacas Multi Mode Microplate Reader with Gen5 2.0 software (BioTek Instruments, USA).	37
Figura 3.3 - Exemplo de uma microplaca com o ensaio TPC.	38
Figura 3.4 - Exemplo de uma microplaca com o ensaio de TFC.	39
Figura 3.5 - Exemplo de uma microplaca com o método DPPH.	40
Figura 3.6 - Exemplo de uma microplaca com o método FRAP.	41
Figura 3.7 - Ilustração da organização das placas de Petri deste estudo para avaliação da atividade antimicrobiana.	42
Figura 4.1 - Correlação entre os valores de TPC e FRAP ($r = 0,9475$).	49
Figura 4.2 - Placas da macroalga, <i>Bifurcaria bifurcata</i> (9), com o mesmo solvente, mas diferentes bactérias (A : <i>Escherichia coli</i> e B : <i>Staphylococcus epidermidis</i>).	52
Figura 4.3 - Atividade antimicrobiana da macroalga <i>Sargassum muticum</i> . (A : menor diâmetro de inibição (crescimento retardado) e B : maior diâmetro de inibição).	57
Figura 4.4 - Atividade antimicrobiana dos extratos da macroalga <i>Ascophyllum nodosum</i> . (A : menor diâmetro de inibição (crescimento retardado) e B : maior diâmetro de inibição).	59
Figura 4.5 - Diâmetro médio das macroalgas castanhas em estudo.	60
Figura 4.6 - Suscetibilidade das bactérias em estudo, sendo a <i>E.coli</i> a mais resistente e a <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>B.cereus</i> as mais afetadas pelas macroalgas em estudo.	61

Figura 4.7 - Representação gráficas do número total de respostas dos solventes para os extratos em estudo; percentagem da contribuição de cada solvente na capacidade antimicrobiana.-----62

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Alguns compostos biologicamente ativos isolados a partir de macroalgas castanhas [adaptado [14]].-----	14
Tabela 1.2 - Resumo de florotaninos encontrados em algas castanhas e as suas possíveis aplicações [adaptado [15], [37]]-----	16
Tabela 1.3 - Nomenclatura para os ácidos gordos presentes nas macroalgas castanhas [adaptado [9]].-----	19
Tabela 4.1 - Rendimento de extração, valores de TPC, DPPH-RSA e FRAP dos extratos em estudo. -----	51
Tabela 4.2 - Inibição das macroalgas em estudo e respectivas concentrações. -----	63

Abreviaturas

AA - Ácido ascórbico

AcET - Acetato de Etilo

AcO - Acetona

AG - Ácido gálico

ARA - Ácido araquidónico

ASE - Extração acelerada por solvente

CHI - Clorofórmio

DAS - Ácido estearidónico

DMSO - Dimetilsulfóxido

DOXP/MEP - 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato/ Via metil-D-eritritol 4-fosfato

DPPH[•]-RSA - Do inglês, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil radical scavenging activity

DW - Peso seco

EAA - Equivalentes de ácido ascórbico

EAE - Extração assistida por enzimas

EAG - Equivalentes de ácido gálico

EEPI - Equivalentes de epicatequina

EPA - Ácido eicosapentanóico

EPI - Epicatequina

EtOH - Etanol

ETR - Equivalente de Trolox

FRAP - Do inglês, ferric reducing antioxidant power

GBIF - Global biodiversity information facility

Hex - Hexano

HSV - Vírus herpes simplex

I - Intermédia

LED - Diodo emissor de luz

LOD - limite de deteção

LOQ - Limite de quantificação

LNA - Ácido α -linolénico

MAE - Extração assistida por micro-ondas

MUFA's - Ácidos gordos mono-insaturados

MVA - Via do mevalonato

NI - Não inibiu

ORAC - Capacidade de absorção do radical oxigénio

PCA - Análise de componentes principais

PUFA's - Ácidos gordos poli-insaturados

R - Resistente

S - Suscetível

SFE - Extração por fluido supercrítico

TFC - Teor de flavonoides totais

TPC - Teor de fenóis totais

TPTZ - 2,4,6-Tris(2-Pyridyl)-S-Triazine

TR - Trolox

TRAP - Do inglês, total radical-trapping antioxidant parameter

UAE - Extração assistida por ultra-sons

UV - Ultravioleta

1. Introdução

O início da vida surgiu na terra à bilhões de anos na hidrosfera. No planeta Terra, 97% da água está contida nos oceanos. A hidrosfera compreende toda a água do planeta, desde os rios, riachos, lagoas, mares, até aos grandiosos oceanos. É credível afirmar que vivemos num planeta azul, composto por 70% de um oceano global, com uma biodiversidade extraordinária de vida marinha. No planeta Terra, a biodiversidade nos oceanos não está uniformemente distribuída, variando topograficamente, sendo que algumas regiões do planeta suportam uma grande percentagem da diversidade biológica global [1], [2].

As algas, organismos marinhos, são organismos muito simples, que abrangem uma grande variedade de seres vivos fotossintéticos. São seres autotróficos (capazes de produzir o seu próprio alimento) e onde existe uma grande diversidade de organismos, no que diz respeito à morfologia, o grau de complexidade da sua estrutura corporal e tamanho. O seu tamanho pode variar entre 3 a 10 μm – seres unicelulares, até 70 m – algas gigantes, crescendo 50 cm por dia. Sendo organismos fotossintéticos, este grupo desempenha um papel fundamental na biodiversidade dos oceanos e constitui a base da cadeia alimentar marinha. Devido à grande variabilidade, as algas marinhas são geralmente divididas em microalgas, apenas visíveis através de equipamentos de ampliação e macroalgas, perfeitamente visíveis a olho nu (Figura 1.1). As microalgas constituem o fitoplâncton e, portanto, vivem nas águas superficiais, suspensas em coluna de água e restrita à zona eufótica. As macroalgas, são algas macroscópicas que podem atingir vários metros de comprimento. Como produtores primários, as macroalgas estão na base da cadeia alimentar marinha apoiando várias comunidades de animais herbívoros. Muitas macroalgas vêm aprimorando as estratégias de defesa, sendo a calcificação (comum em algas vermelhas, como a família *Carollinaceae*) uma das mais comuns, embora também produzam metabolitos secundários (terpenos, polifenóis, etc.) que atuam como desmotivadores na sua ingestão por animais herbívoros [3].

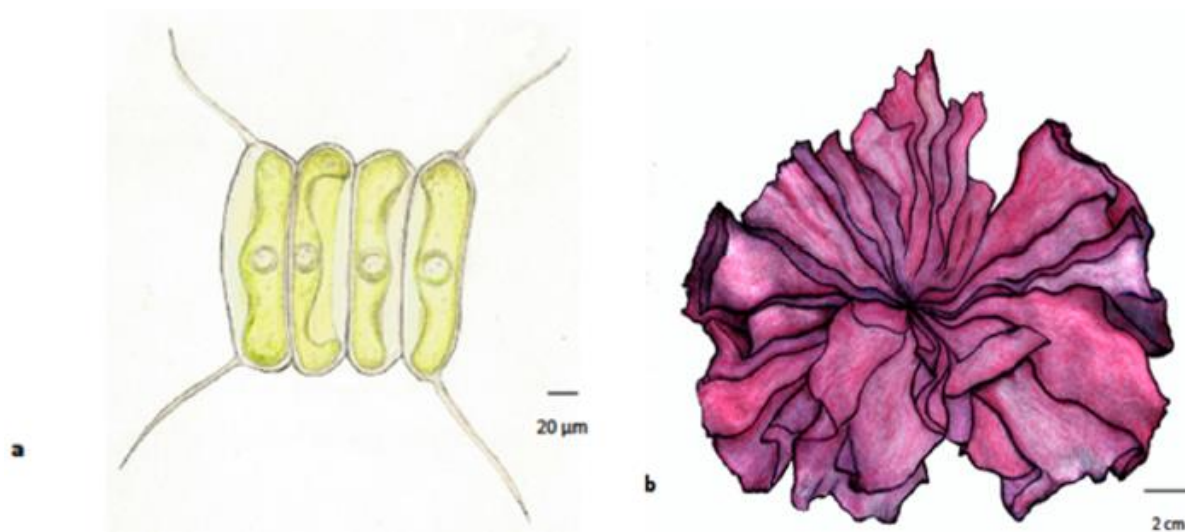


Figura 1.1 - Algas: (a) microalgas, necessitam do uso de um microscópio para observação (*Scenedesmus*, Chlorophyta); (b) macroalgas são algas maiores, visíveis a olho nu, (*Porphyra umbilicalis*, Rhodophyta) [adaptado [4]].

As macroalgas constituem uma nova fonte de compostos bioativos (compostos que têm benefícios para o ser humano) que têm sido utilizadas para fins nutricionais e medicinais. Durante as últimas quatro décadas, novos compostos têm sido isolados destes organismos e muitas dessas substâncias demonstraram possuir atividades biológicas e antioxidante [2]. As macroalgas são definidas como sendo organismos marinhos fotossintéticos eucariotas e macroscópicos. A classificação mais comum das macroalgas está relacionada com a sua pigmentação, sendo que existem 3 grupos: algas verdes (Chlorophyta), vermelhas (Rhodophyta) e castanhas (Ochrophyta) [2], [5]–[7].

1.1. Macroalgas

As macroalgas são seres fotossintéticos, macroscópicos e multicelulares com órgãos diferenciados, habitualmente são encontradas nas costas rochosas, tanto em água doce como em água salgada. Apresentam uma grande variedade de tamanho, cor e forma, podendo ser visíveis na superfície das rochas, apresentando apenas alguns milímetros de comprimento e um aspeto frágil, ou existirem em zona eufóticas, isto é, zonas de maior profundidade (normalmente até 200 m), onde o limite inferior de penetração da luz é eficaz para a realização da fotossíntese, e atingir tamanhos gigantes, superiores a 50 metros e dominar florestas aquáticas [2], [5], [6], [8].

As macroalgas apresentam diversas colorações, devido à combinação de diferentes pigmentos fotossintéticos presentes nas células. A existência destes pigmentos estão na base da

sua classificação. Estes organismos marinhos pertencem ao domínio Eukaryota e a dois reinos distintos, ao reino Plantae onde estão inseridas as algas verdes (Chlorophyta) e vermelhas (Rhodophyta) e ao reino Chromista onde se encontram as algas castanhas (Ochrophyta) [5], [7], [9].

As algas verdes estão incluídas no Filo Chlorophyta e apresentam pigmentação idêntica à das plantas terrestre, contêm pigmentos fotossintéticos como a clorofila *a* e *b* e carotenóides como o β -caroteno, a luteína, a violaxantina, a neoxantina e a zeaxantina. As algas vermelhas pertencem ao Filo Rhodophyta, possuem clorofilas *a* e carotenóides como o α -caroteno, o β -caroteno, a luteína, a zeaxantina e as ficobilinas. As algas castanhas estão incluídas no Filo Ochrophyta e os seus pigmentos incluem as clorofilas *a* e *c* e carotenóides como o β -caroteno, a violaxantina e a fucoxantina, sendo este último maioritário e responsável pela coloração acastanhada [2], [5], [8].

Segundo a base de dados *AlgaeBase* [10], atualmente existem 46 930 espécies de algas, pertencentes ao domínio Eukaryota. No reino Plantae existem cerca de 19 057 espécies, sendo que 7 296 espécies são do filo Rhodophyta e 6 709 espécies do filo Chlorophyta e por fim no reino Chromista existem cerca de 25 600 espécies, sendo que 4 317 pertencem ao filo Ochrophyta [10].

As macroalgas são também conhecidas por produzir uma grande quantidade de compostos bioativos, envolvidos nos mecanismos naturais de defesa ao stress biótico e abiótico. Assim são considerados um promissor produto comercial de compostos bioativos, estimulando investigações adicionais de novas aplicações medicinais e nutricionais [2], [7].

A composição nutricional e química das macroalgas varia consoante a espécie, estação do ano e habitat. As macroalgas são conhecidas por serem um alimento nutritivo com poucas calorias, tanto para humanos como animais, são constituídas por cerca de 80-90% de água e o seu peso seco contém cerca de 50% de hidratos de carbono, apresentando ainda na sua composição compostos valiosos, como minerais (7-36%), lípidos (1-5%), polissacarídeos (15-76%) e proteínas (5-47%). As algas são ainda uma fonte de vitaminas solúveis (vitamina B, B2, B3, B5, B12 e C) e insolúveis (vitamina A, E, D e K) e de minerais (Ca, Na, K, S, I, Mg, Fe, Zn, Mn, etc.) [7], [9], [11].

Em relação aos seus compostos constituintes, os mais estudados têm sido os polissacarídeos, pretendendo-se estudar formas de usar estes polissacarídeos como espessantes, estabilizantes

ou agentes emulsionantes em alimentos. As macroalgas apresentam ainda uma proporção alta de ácidos gordos polinsaturados sulfatados e outros compostos lipídicos com propriedades benéficas para a saúde. Além disso, apresentam um elevado teor de micronutrientes, como vitaminas e outros metabolitos secundários, geralmente antioxidantes, como polifenóis ou pigmentos [7].

Tendo em conta a vasta diversidade de moléculas ativas contida nas macroalgas, os extratos de algas têm sido submetidos a testes de bioatividade, demonstrando ter inúmeras propriedades biológicas, tais como: anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, antidiabético, anticancerígeno, neuro protetor e foto protetor [7].

Abordando o enquadramento das macroalgas no mundo, as algas marinhas apresentam uma ampla distribuição geográfica, variando no número de espécies consoante o país [12].

Desde há alguns séculos que na Ásia Oriental a exploração e a utilização de algas como alimento é uma prática muito conhecida. O Japão, a China e a Coreia do Sul são os maiores consumidores de algas marinhas como alimento. No entanto, com o avanço do conhecimento sobre este ser marinho, também tem sido usado como fertilizantes e aplicações na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica [7], [12], [13].

Nos últimos 50 anos houve um aumento do consumo de algas a nível mundial, que conduziu ao desenvolvimento de indústrias de cultivo, uma vez que os stocks naturais não conseguem satisfazer as necessidades de procura (figura 1.2) [12].

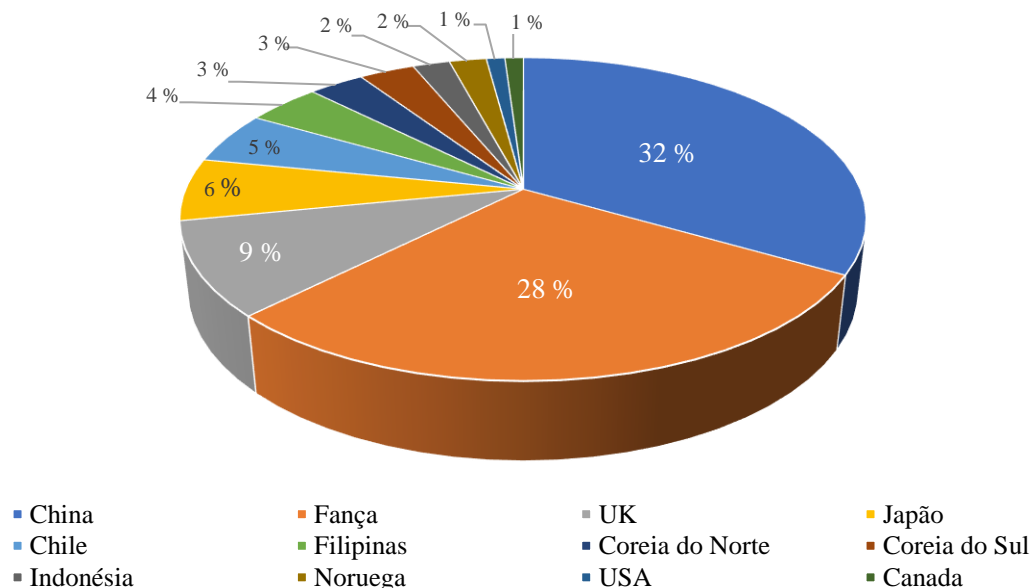


Figura 1.2 - Percentagem da produção de algas marinhas cultivadas nos principais países do ranking mundial [Adaptado [2]].

Em Portugal, a exploração de algas ainda está pouco desenvolvida [7]. Contudo, têm sido desenvolvidos imensos estudos científicos de modo a encontrar e isolar compostos bioativos a partir das macroalgas. A capacidade das algas sobreviverem em habitats complexos, sujeitas a condições extremas, dada a sua capacidade de desenvolver mecanismos de defesa, através da produção de uma grande variedade de metabolitos secundários, tem suscitado um enorme interesse pelos investigadores [14], [15].

Em suma, as macroalgas podem ser consideradas uma fonte de moléculas ativas com propriedades biológicas com potencial aplicação na indústria alimentícia, cosmética e farmacológica, não só pela sua composição como também pela sua diversidade e disponibilidade de recursos [7].

1.1.1. Macroalgas Castanhas

As macroalgas castanhas pertencem ao filo Ochrophyta e à classe Phaeophyta. Como pigmentos fotossintéticos, além das clorofilas *a* e *c*, as algas castanhas diferenciam-se por apresentarem grande quantidade de carotenóides, em que se destaca a fucoxantina, sendo este um pigmento que concede a coloração acastanhada à alga [16], [17]. Relativamente à estrutura da parede celular, esta contém celulose, alginato, fucoïdanos, laminarinas e polissacarídeos. Conservam a sua energia sob forma de amido e manitol, é um álcool poli-hídrico com poder edulcorante [2], [17]. Várias espécies de algas castanhas podem ser usadas diretamente como alimento, outras também como fertilizantes e ainda algumas das espécies utilizadas mais especificamente na indústria farmacêutica [10]. Na Figura 1.2 estão representadas apenas as espécies de algas castanhas utilizadas neste trabalho, tendo estas sido colhidas no atlântico norte (Portugal – Galiza, mais especificamente).



Figura 1.3 - Espécies de macroalgas castanhas [Adaptado [10]].

A *Himanthalia elongata*, reconhecida como “esparguete do mar”, apresenta ramificações na forma de “tiras” com 2 ou 3 metros de comprimento e 1 centímetro de largura. Esta alga tem um tempo de vida útil de 2 a 5 anos e encontram-se normalmente na costa. Geograficamente pode ser encontrada entre o sul do oceano Ártico e o nordeste do oceano Atlântico, no mar Báltico e no mar do Norte. Na Península Ibérica localizam-se numa área entre o norte de Portugal e o norte de Espanha [10], [18]. Para além do seu consumo como alimento, pode ser utilizada como fertilizante ou em produtos de cuidados pessoais (champôs, tratamentos para o cabelo, produtos de limpeza facial e de cuidados da pele). Na sua composição química pode-se encontrar aminoácidos essenciais, as vitaminas A, C e E e outros minerais naturais, destacando-se pelo seu elevado teor de ferro [5], [10], [18].

A *Undaria pinnatifida*, também conhecida por “Wakame”, atinge entre 1 a 3 metros de comprimento. Tem origem no Pacífico e já foi identificada no Norte de Portugal. Esta alga é rica em hidratos de carbono, lípidos, minerais, aminoácidos essenciais e vitaminas. Contém uma grande quantidade de fucoxantina, que é o pigmento que tem sido referenciado por conter

propriedades dietéticas. De acordo com a literatura, tem sido descrito que o consumo desta alga beneficia a saúde, como por exemplo, a regulação menstrual, na purificação do sangue e benefícios para o cabelo e para a pele [10], [18].

A *Pelvetia canaliculata*, é uma espécie comum na Europa, não ultrapassa os 15 cm de comprimento e é uma espécie perene, com duração de pelo menos dois anos antes de atingir a maturidade e tem uma vida útil de 4 a 5 anos. Esta alga cresce presa a substratos duros e podem estar na marca d'água ou acima dela. Esta macroalga sobrevive até 8 dias fora da água e tolera até 65 % de perda de água. Quando a maré enche, reidrata rapidamente quando entra em contacto com a água e recupera os nutrientes que perdeu quando se encontrava exposta ao ar [10], [18]. A *P. canaliculata*, pode ser encontrada no Atlântico Nordeste, do oceano Ártico até à Península Ibérica, no Canal da Mancha e no mar do Norte. Em termos de composição química, esta alga contém arabinose, fucoidinas, fucose galactose, glicose e peptídeos. Pode ser utilizada diretamente para alimentação animal, mas também é muito utilizado em produtos de cosméticos, por estimular a síntese de colagénio e dar ao tecido conjuntivo propriedades elásticas [18].

A *Saccharina latissima*, cresce nas florestas aquáticas de águas superficiais e claras, ricas em nutrientes e temperaturas abaixo dos 20 °C, podem alcançar 30 a 80 m. A cinza destas algas é rica em iodo e em grandes quantidades podem ser utilizadas para a produção de sabão. Utiliza-se também frequentemente como fertilizante [18].

A *Bifurcaria bifurcata*, é uma alga perene que se encontra distribuída ao longo da costa do Atlântico Noroeste. O seu crescimento chega até aos 30 cm de comprimento. Esta macroalga contém diterpenos acíclicos (biossintetizados a partir do geranylgeraniol), não sendo essa variedade muito comum na natureza. No entanto o diterpeno bifurcadiol é um citotóxico linear e exhibe uma citotoxicidade contra linhagens de células tumorais humanas [18].

A *Laminaria ochroleuca*, denominada por “Kombu atlântico”, tem um comprimento máximo de 2 m e encontra-se predominantemente em zonas de águas baixas. Trata-se de uma alga perene, ou seja, mantém a sua estirpe ao longo do ano, regenerando a lâmina, apenas a cada ano. Podem ser encontradas até 30 metros de profundidade e estão distribuídas ao longo da costa da Península Ibérica. São conhecidas por reduzir a inflamação quando aplicada na pele [10], [18]. Os seus extratos têm aplicação na indústria da cosmética, protegendo o ADN dos raios UV e prevenindo o envelhecimento precoce da pele [19].

A *Sargassum muticum*, é uma alga nativa da Ásia Oriental. Apresenta um crescimento muito rápido (cerca de 2 a 4 cm por dia), vários mecanismos de dispersão, e é considerada uma espécie invasora em quase todo mundo. Esta invasão, é considerada favorável, porque tem aumentado os ecossistemas marinhos. Na Península Ibérica a distribuição e abundância é muito variável devido às condições ambientais, como a temperatura do mar, condições hidrodinâmicas variáveis e topografia [18]. Esta alga é muito estudada por ser rica em ácidos gordos, sendo predominante a presença de ácido palmítico. Foi também observada a presença de Apo-9'-fucoxantina, um composto lipofílico, que pertence à família dos terpenos e apresenta atividade anti-inflamatória [20].

A *Fucus spiralis*, cresce até 10 cm de comprimento e vive por 4 anos e são das algas marinhas bastante comuns [18]. Esta alga não é utilizada como alimento, mas os seus extratos são usados como anti-inflamatórios, anticelulíticos e também para tratamentos para emagrecer. Esta espécie contém polissacarídeos, fucoídano e laminarina, polifenóis, micronutrientes e minerais, potássio, bromo, cloro magnésio, cálcio, ferro e silício, manitol, vitaminas e pró-vitaminas A, D e C e lípidos [21].

As algas da espécie *Ascophyllum nodosum*, têm tipicamente entre 3 a 4 m de comprimento, também é uma alga perene e podem ter um tempo de vida até 15 anos. Podem ser encontradas no norte de Portugal. Em relação à sua utilização, pode ser usada como alimento, na saúde e como cosmético. Esta macroalga é muito eficaz na acumulação de nutrientes e minerais da água do mar, por isso é uma alga muito valiosa. Existem imensos produtos cosméticos e alimentares que incorporam esta alga como ingrediente [18].

Nas Figuras 1.3 e 1.4 é possível observar a localização das macroalgas castanhas (Ochrophyta), no mundo (Figura 1.3) e também na Península Ibérica (Figura 1.4), de acordo com o site GBIF, “*Global biodiversity information facility*”, sendo que nestes dois mapas também aparecem macroalgas de rio [22].

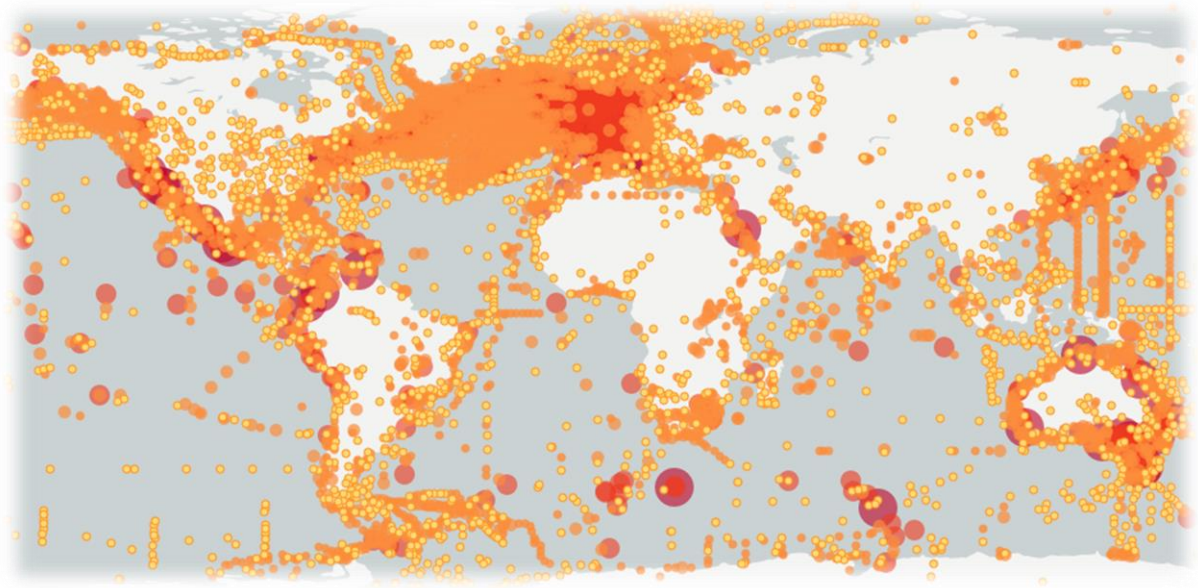


Figura 1.4 - Mapa de ocorrência mundial de algas castanhas, as cores dos círculos representam a abundância das macroalgas castanhas, círculo vermelho escuro muito abundante, amarelo pouco abundante.

[Adaptado [22]]



Figura 1.5 - Mapa de ocorrência da Península Ibérica de algas castanhas, as cores dos círculos representam a abundância das macroalgas castanhas, círculo vermelho escuro muito abundante, amarelo pouco abundante.

[Adaptado[22]].

1.2. Ecologia das macroalgas

Na ecologia das macroalgas dominam dois requisitos ambientais, viver na água do mar (ou pelo menos água salobra) e precisar de luz suficiente para que a fotossíntese ocorra. Outro requisito comum é o ponto de fixação e, portanto, as algas marinhas habitam comumente nas zonas costeiras e dentro dessas zonas, em frentes marítimas rochosas. Além disso, existem poucos géneros, como exemplo a espécie *Sargassum*, que não vivem presos a um substrato rochoso, mas flutuam livremente [3].

As algas ocupam vários nichos ecológicos, chamados de florestas marinhas, na superfície, são humedecidas apenas pela espuma do mar, enquanto algumas espécies podem aderir a um substrato a vários metros de profundidade. As algas que se adaptaram a viver em poças de maré, devem resistir a mudanças drásticas em temperatura, salinidade e eventualmente à secagem [3], [5].

Como as macroalgas absorvem dióxido de carbono e libertam oxigénio na fotossíntese, as folhas também podem contribuir para o sequestro de carbono no oceano, através do qual as folhas das macroalgas derivam da costa para as bacias profundas do oceano e afundam no mar sem ser remineralizado pelos organismos. A importância deste processo para o armazenamento de “carbono azul” é atualmente estudada e discutida entre investigadores [3], [5], [23].

1.3. Macroalgas Castanhas e suas aplicações

Há muitos séculos que as propriedades terapêuticas das macroalgas castanhas são conhecidas, porém a investigação científica relacionada com o estudo sistemática destas propriedades iniciou-se na década de 70. Através destes estudos, os investigadores conseguiram isolar compostos químicos de algas castanhas que apresentam atividade anticancerígena [8].

Em muitos países com costa de zonas marítimas, as algas são utilizadas como fonte de alimento, aplicações industriais ou como fertilizante. O maior foco de cultivo de algas marinhas e que originou uma enorme indústria encontra-se na Ásia. Atualmente, as algas castanhas são utilizadas principalmente como alimento, em cosméticos, na aquicultura, como fertilizantes e na indústria farmacêutica (como fonte de ficocolóides e outros compostos químicos) (figura 1.6) [12]. Em Portugal o seu uso ainda é diminuto, com exceção de algumas zonas nos Açores. No entanto, existe uma grande procura de um dos seus constituintes, nomeadamente o ficocolóide (agar) [21].

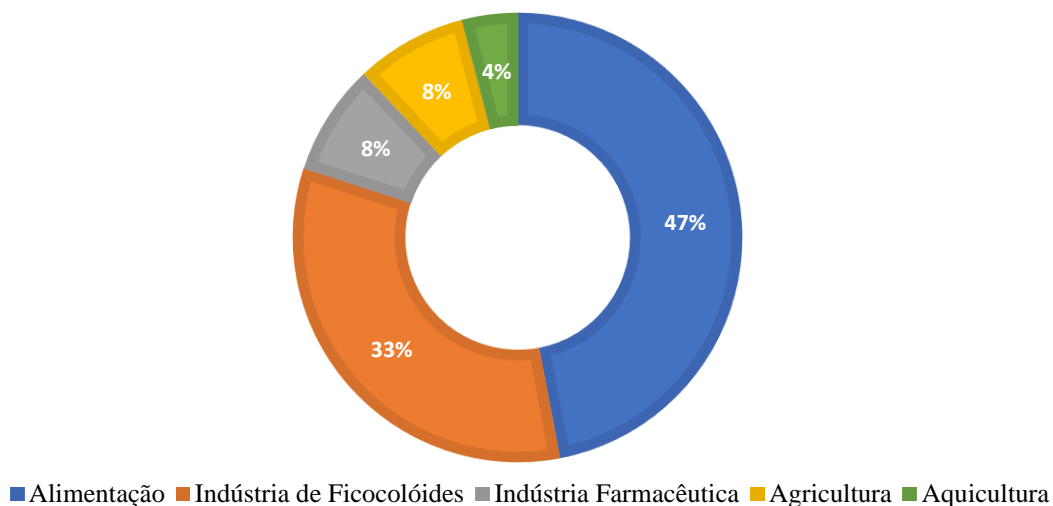


Figura 1.6 - Utilização mundial de macroalgas castanhas [adaptado [19]].

As macroalgas castanhas, na medicina tradicional asiática, são usadas principalmente em condições como hipotireoidismo, fadiga, celulite, tosse, asma, hemorroidas, doenças de estômago e dores de cabeça. Por outro lado, são também usadas para promover a perda de peso e ajudar no cuidado da pele. A espécie, *Laminaria japónica* apresenta uma forte atividade anticancerígena, diminuindo a propagação de metástases. Estudos sugerem que o uso regular desta alga diminuiu consideravelmente o risco de cancro da mama [8].

1.3.1. Indústria alimentar

O cuidado com a alimentação tem aumentado nos últimos anos, o que causou um interesse crescente pelos grupos alimentares funcionais, em que as algas desempenham um papel fundamental, uma vez que oferecem diversos benefícios, tais como, fisiológicos, anti-hipertensivos, antioxidantes ou anti-inflamatórios [9], [21], [24].

Um alimento funcional pode ser descrito como um alimento que beneficia a saúde em uma ou mais funções fisiológicas, aumenta o bem-estar e/ou suprime o aparecimento e desenvolvimento de doenças. As funcionalidades são muito mais preventivas do que curativas [24]. As macroalgas ao contrário de muitos alimentos disponíveis hoje em dia, são um alimento natural com alto valor nutricional e baixo teor de gordura [4], [6].

Nas macroalgas os florotaninos e as frações de polissacarídeos são as que têm chamado mais atenção dada à sua importância na alimentação funcional e aplicações nutraceuticas. Contudo, as algas também contêm elementos nutricionais, como proteínas, lípidos, carboidratos, vitaminas e minerais, no qual o seu conteúdo varia dependendo da estação e da área de produção. Todos os minerais essenciais e micronutrientes necessários para a nutrição

humana estão presentes nas algas, afirmando a sua credibilidade para serem alimentos funcionais [9].

Em relação ao teor de minerais, as algas marinhas apresentam um alto teor de minerais, por exemplo Ca, Na, K, S, I, Mg, Fe, Zn, Mn, entre outros. Comparativamente com os vegetais tradicionais, as algas contêm 10 a 100 vezes maior teor de minerais. Por isso, as algas marinhas representam uma ótima fonte de suplementos dietéticos devido ao seu alto teor de minerais, vitaminas e polissacarídeos estruturais (fibras), que podem facilitar o trânsito intestinal e diminuir o nível de colesterol no sangue [4], [9].

Atualmente, a indústria alimentar está mais focada na obtenção de ficocolóides, para produzir compostos orgânicos que formam sistemas coloidais na água permitindo assim a produção de gelatinas consistentes à temperatura ambiente. Para além destes os mais estudados são os ácidos gordos, pigmentos, fenóis e os polissacarídeos [4], [6], [9].

Os polissacarídeos e o alginato produzido pela classe Phaeophyceae continuam a ser os mais utilizados na indústria para gelificação, emulsificação, estabilização, espessamento e agentes flocculantes. Este tem características estruturais e a sua funcionalidade é de espessamento [6], [9].

Em relação à composição em pigmentos, o carotenóide fucoxantina, presente em todas as algas castanhas, apresenta efeitos protetores contra a deficiência de vitamina A [4].

Vários estudos comprovaram que compostos das macroalgas apresentam efeito inibitório contra agentes patogénicos de origem alimentar, como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ou *Salmonella sp.* Assim, estes compostos extraídos das algas, são incorporados nos produtos alimentares ou mesmo no material da embalagem, de modo a evitar a deterioração do alimento causada pelo microrganismo. Acresce que a utilização destes compostos naturais inibitórios do crescimento bacteriano, quer nas embalagens quer nos produtos comerciais, prolonga a vida útil dos produtos e reduz a utilização de compostos sintéticos e de plásticos [6], [7].

Recentemente, as algas têm sido incorporadas na ração animal. Contudo, as características nutricionais destas rações são variáveis, pois o teor em nutrientes presente nas algas varia consoante a época e do local de colheita e da concentração de nutrientes existente na água. Os animais ruminantes são os que mais consomem uma alimentação à base de algas marinhas e em grande quantidade [4]. As macroalgas, como contém compostos antimicrobianos, também

podem ser utilizados como substitutos de antibióticos comerciais, aumentando a sobrevivência do animal e também a qualidade e segurança alimentar dos produtos alimentícios que serão consumidos pelos humanos [4]. Pela mesma razão, estas algas são utilizadas na alimentação de peixes de aquicultura, com o objetivo de aumentar a resistência das espécies aquáticas contra doenças bacterianas e virais, melhorando a sua sobrevivência, contra vírus e bactérias que ameaçam várias espécies [4], [6], [7].

1.3.1.1. Comestibilidade das macroalgas

A presença de macrominerais e elementos vestigiais nas macroalgas, permite caracterizar a sua comestibilidade. Algumas dessas macroalgas só podem ser usadas como especiarias ou suplementos alimentares, devido ao seu elevado teor de alguns elementos, como por exemplo As, I, Na, K, Ca, Cd, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, etc. Por isso, ao realizar a amostragem das macroalgas é importante decidir quando irá ser feita a coleta (amostragem, estação, idade e tamanho), porque as concentrações de minerais podem variar. Como exemplo, a macroalga *Dasycladus vermicularis* (chlorophyta) na costa grega apresenta maior concentrações de metais (Zn, Cd e Ca) no verão, sendo que de março a julho a sua concentração aumenta gradualmente. Ou seja, as concentrações de metais aumentam com a idade do tecido, porque os metais são irreversivelmente absorvidos e são criados mais locais de ligação. Contudo, o conteúdo de outros elementos, como cobre, diminui com a idade [25], [26].

Também podem ser obtidos teores diferentes se toda a amostra é homogeneizada e posteriormente analisada, ou se apenas uma parte vai ser selecionada para fazer o tratamento. É essencial decidir quais partes da alga serão usadas para monitorização. O padrão de acumulação nas várias partes (base, estipe, órgãos reprodutivos e pontas de crescimento) é semelhante para Cu, Pb e Zn, enquanto o ferro acumula principalmente na base das algas e o arsénio acumula-se nos órgãos reprodutores e nas pontas de crescimento [2].

Por outro lado, o tipo de algas também pode influenciar a absorção dos vários elementos e metais. As paredes celulares das três divisões de macroalgas marinhas (Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta) possuem eletrostática e propriedades quelantes que são responsáveis por bioabsorção. A presença das grandes quantidades de polissacarídeos aniônicos que possuem uma forte capacidade de troca iónica, produz a capacidade de as macroalgas serem eficazes bioabsorventes [27]–[29].

1.3.2. Indústria farmacêutica e cosmética

As atividades biológicas atribuídas aos metabolitos secundários de origem marinha, em particular, aos de origem nas macroalgas castanhas têm sido imensamente descritas [14]. Estas atividades biológicas, incluem as atividades anti-inflamatórias, antibacterianas, anti diabetes, antioxidantes, antivirais, anti-hipertensivas, anti-obesidade, antifúngicas, anti-tumorais, anti fotoenvelhecimento, entre muitas outras [13], [14], [19]. Na Tabela 1.1, apresenta-se alguns compostos extraídos e isolados de algumas macroalgas castanhas com potenciais benefícios para a saúde.

Tabela 1.1 - Alguns compostos biologicamente ativos isolados a partir de macroalgas castanhas [adaptado [14]].

Classe do composto	Composto	Macroalga	Benefício para a saúde	Referência
Carotenóides	Fucoxantina	<i>Undaria pinnatifida</i> ; <i>Ascophyllus nodosum</i>	Anti obesidade e anti diabetes	[30]
	Zeaxantina		Anti tumoral	[31], [32]
	Luteína		Diminuição do risco de doenças oftalmológicas	[33]
Esteróis	β -sitosterol	<i>Pelvetia siliquosa</i>	Redução do colesterol	[8]
	Fucosterol		Anti diabetes	[8], [34]
Polissacarídeos	Galatofucanos	<i>Adenocystis utricularis</i>	Inibição da infecção do HSV 1 e 2 (antiviral)	[8]
	Fucoidanos	<i>Ecklonia cava</i> , <i>Sargassum hornery</i> , <i>Costaria costalla e</i> <i>Undaria pinnatifida</i>	Antitumoral	[8], [31], [35]
	Laminarina	<i>Laminaria japonica</i>	Anti apoptótica; Diminui o risco de cancro de mama	[8], [31]
Diterpenos	8,10,18-tri-hidroxi-2,6-dolabeladieno	<i>Dictyota pfaffii</i>	Inibição da infecção de HSV-1; diminuição do teor de proteínas precoces de HSV-1	[36]
	(6R)-6-hidroxidicotoma-4,14-dieno-1,17-dial	<i>Dictyota menstrualis</i>		

Os ficocolóides extraídos das macroalgas, tais como o agar, tem um papel importante na indústria farmacêutica devido as suas propriedades estabilizantes. Por exemplo, o agar é utilizado na elaboração de meios de cultura gelificados (cultura de bactérias, algas, fungos,

entre outros) [4], [12], [21]. O agar é ainda usado na separação de macromoléculas por eletroforese e na sequenciação de ácido desoxirribonucleico (ADN). O alginato é utilizado na indústria médica, pela sua estabilidade numa gama larga de pH e salinidade em casos de intoxicação por ingestão, mas também como agente de neutralização de metais pesados e radioativos, podendo ser usado em compressas e ligaduras para queimaduras, ajudando na cicatrização [4], [21].

De acordo com a literatura, alguns estudos descrevem a aplicação de polifenóis extraídos das macroalgas em produtos odontológicos para o tratamento da periodontite crónica, tratamentos para eliminar fungos das unhas, entre outros. Em relação à cosmética, determinados estudos abordam o desenvolvimento de tratamentos contra o acne [7] e também aplicação de compostos bioativos extraídos das macroalgas castanhas que retardam o envelhecimento da pele, clarificam a pele e combatem o cancro da pele [19].

Os florotaninos presentes em grande quantidade nas macroalgas castanhas, também têm evidenciado várias potencialidades tanto farmacológicas, como da área da cosmética e também alimentar [15]. Na Tabela 1.2, apresenta-se algumas das possíveis aplicações dos florotaninos extraídos das macroalgas castanhas.

Tabela 1.2 - Resumo de florotaninos encontrados em algas castanhas e as suas possíveis aplicações [adaptado [15], [37]]

Florotaninos	Macroalgas Castanhas	Aplicação
Diecol	<i>Eisenia bicyclis</i> e <i>Ecklonia cava</i>	Anti-diabético
Ecol	<i>E. bicyclis</i>	
Florofucofuroecol-A	<i>Ecklonia stolonifera</i>	
Difloreto-hidroxycarmalol	<i>Ishige okamurae</i>	
Dioxinodesidroecol	<i>E. cava</i>	Anti-cancerígeno
Ecol	<i>E. stolonifera</i>	Anti-hipertensão
Florofucofuroecol		
Diecol		
Diecol	<i>E. cava</i> e <i>E. stolonifera</i>	Anti-fotoenvelhecimento
Ecol		
Diecol	<i>E. cava</i>	Inibição MMP (“ <i>matrix metalloproteínases</i> ”)
Ecol e Fucofuroecol-A	<i>E. bicyclis</i>	
8,8'-Biecol	<i>E. bicyclis</i> , <i>E. cava</i> e <i>Ecklonia kurome</i>	Antioxidante
Florofucofuroecol-A		
Ecol		
Diecol		
6,6'-Biecol	<i>E. cava</i>	Anti-HIV
8,8'-Biecol		
8,8'-Diecol		
6,6'-Biecol	<i>E. cava</i>	Anti-alérgico
Florofucofuroecol B	<i>Eisenia arborea</i>	
Ecol e diecol	<i>E. stolonifera</i>	

1.4. Compostos Bioativos nas macroalgas castanhas

Os compostos bioativos existentes nas macroalgas advêm dos metabolitos secundários. Estes compostos são sintetizados pelas algas e não são essenciais para a sobrevivência da espécie. Estes compostos biologicamente ativos apresentam uma distribuição mais limitada na natureza, isto é, apenas são biossintetizados por organismos específicos. A produção de metabolitos secundários nas algas varia consoante a espécie, o habitat e as condições ambientais, tendo um papel essencial na proteção contra o stress abiótico e biótico. Apesar de não serem fundamentais para a sobrevivência dos organismos, apresentam um papel vital para o seu bem estar [38]. Uma das grandes funções destes metabolitos é promover o mecanismo de defesa contra agentes

patogénicos e predadores, como os animais de pasto marinho, mas também permite às algas resistirem e sobreviverem a mudanças de temperatura, salinidade, condições extremas de nutrientes e radiação ultravioleta (UV) [39].

Alguns dos metabolitos secundários sintetizados pelas macroalgas, podem apresentar benefícios para a saúde humana. Alguns já foram descritos, outros ainda serão abordados durante este estudo. Nos últimos anos tem havido um grande interesse em encontrar novos compostos biologicamente ativos que apresentem um potencial para combater a doenças como cancro, alergias, stress oxidativo, inflamação, obesidade, trombose, doenças neurodegenerativas, entre outras [14], [40].

Os compostos isolados de algas têm tido respostas muito positivas nomeadamente à atividade antibacteriana, anti-hipertensiva, antiviral, anticancerígena e antioxidante, etc. Espera-se que estes compostos naturais possam substituir os compostos sintéticos que são utilizados atualmente e que apresentam alguns efeitos secundários [7], [14].

As macroalgas castanhas, classe escolhida para este estudo, são quimicamente constituídas por polissacarídeos, proteínas, baixo teor de lípidos, essencialmente em ácidos gordos polinsaturados sulfatados, esteróis, carotenóides (fucoxantina e xantofilas) e polifenóis, nomeadamente os florotaninos [7], [41], [42].

1.4.1. Polissacarídeos

Os polissacarídeos são um dos principais componentes estruturais da parede celular das algas. Estes podem ser classificados como neutros ou ácidos, lineares ou ramificados [7], [43]. Nas algas castanhas a presença de polissacarídeos sulfatados com um alto grau de complexidade situa-se na faixa de 4 a 16% de peso seco (DW) [7]. As macroalgas castanhas são uma fonte rica de alginato, em que o seu conteúdo em massa seca varia entre 14 e 40% [7], [44]. Para além deste composto, também contém β -glucanos (laminaranos), celulose e heteroglicanos que estão presentes em quantidades bastante elevadas [7], [44].

Os laminaranos são β -D- glucanos de baixo peso molecular e apresentam uma estrutura linear com ligações β - glicosídicas. Existem diferentes tipos de laminaranos classificados de acordo com seu comprimento e grau de ramificação. Os fucoidanos são uma família de homo- e heteropolissacarídeos sulfatados que são constituídos principalmente por unidades de L-fucopirranose. Apresentam cadeias alternada de L-fucopirranose e grupos sulfato localizados em

C2, C4 ou dissubstituídos em C2 e C4. Os grupos acetil e D-galatose, D-xilose, D-manose, L-ramanose e ácido D-glucurónico foram identificados como pertencentes a esta família [7], [45].

A atividade antimicrobiana dos polissacarídeos depende do peso molecular, da densidade de carga, do teor em sulfatos e das características estruturais e de conformação. Vários estudos indicam a inibição do crescimento de bactérias patogênicas na presença de extratos de macroalgas castanhas *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Undaria pinnatifida* [7], [36], [46].

1.4.2. Proteínas

Nas macroalgas castanhas o teor de proteína em peso seco varia entre 5 a 15 % [7], [47], [48]. Porém, este teor varia também de acordo com a estação do ano, sendo encontrado em maior concentração durante o inverno e no início da primavera e em concentrações mais baixas no verão e início do outono [7], [48], [49]. As proteínas são ativamente funcionais nas macroalgas e pertencem a dois grupos, lectinas e ficobiliproteínas. As proteínas das algas contêm todos os aminoácidos, existente na natureza, principalmente a glicina, a alanina, a arginina, a prolina, o ácido glutâmico e ácido aspártico [7].

1.4.3. Compostos Lipofílicos

A fração lipofílica das algas castanhas é essencialmente constituída por ácidos gordos, esteróis e terpenos.

Os ácidos gordos são constituídos por uma cadeia alifática, com ou sem ligações duplas, e um grupo carboxílico, sendo denominados por insaturados ou saturados, respetivamente. Os insaturados dependem do número de ligações duplas e são divididos em monoinsaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAs) [7], [9].

Os ácidos gordos das algas castanhas são constituídos geralmente por PUFAs (Figura 1.5), em particular ómega-3 e ómega-6. Destes, o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3), o ácido estearidónico (DAS, 18:4n-3) e o ácido α -linolénico (LNA, 18:3n-3) pertencem à família dos ómega-3, sendo que o ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) pertence à família dos ómega-6 encontrados nas algas (Tabela 1.3) [30].

Tabela 1.3 - Nomenclatura para os ácidos gordos presentes nas macroalgas castanhas [adaptado [9]].

Número de C: insaturações	Nome comum	Ómega	IUPAC
18:3n-3	Ácido α -linolénico	ω -3	Ácido 9Z,12Z,15Z-octadecatrienóico
18:4n-3	Ácido estearidónico	ω -3	Ácido 6Z,9Z,12Z,15Z-octadecatetraenóico
20:4n-6	Ácido araquidónico	ω -6	Ácido 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenóico
20:5n-3	Ácido eicosapentaenóico	ω -3	Ácido 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenóico

Os PUFAs ómega-3 têm demonstrado ter efeitos benéficos na saúde, tais como redução de doenças cardíacas, trombose e aterosclerose [8].

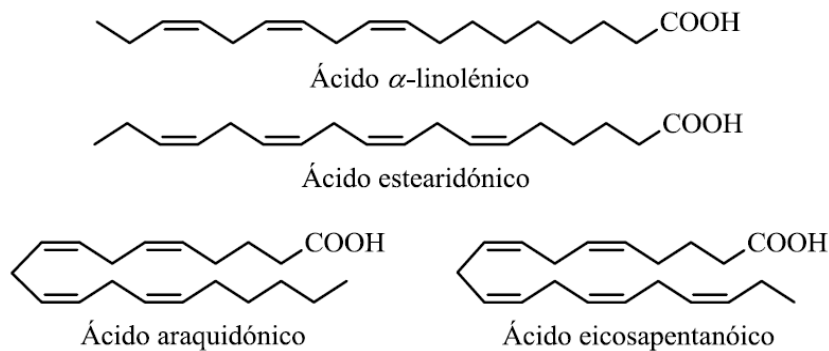


Figura 1.7 - Estrutura dos ácidos gordos, PUFAs, presentes nas macroalgas castanhas [adaptado [30]].

Quando os ácidos gordos são encontrados esterificados com uma molécula de glicerol, formam-se os glicerídeos. Estes podem ser classificados em mono, di ou triacilgliceróis, consoante o número de ácidos gordos associados com o glicerol. Os triacilgliceróis (Figura 1.6) são lípidos neutros acumulados nas algas como produtos de armazenamento e reservatório de energia [9].

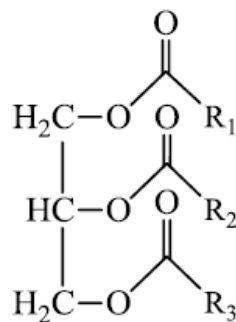


Figura 1.8 - Estrutura geral de um triacilglicerol (R1, R2, R3, são os radicais dos ácidos gordos) [adaptado[9]].

As algas castanhas podem apresentar na sua composição níveis elevados de lípidos totais (10-20% do peso seco), que para além dos triacilgliceróis, contêm os glicerolípidos [30]. Os glicerolípidos (Figura 1.7) mais comuns das macroalgas castanhas são o monogalactosil-diacilglicerol, o digalactosil-diacilglicerol e o sulfolípidio sulfoquinovosil-diacilglicerol [9], [30].

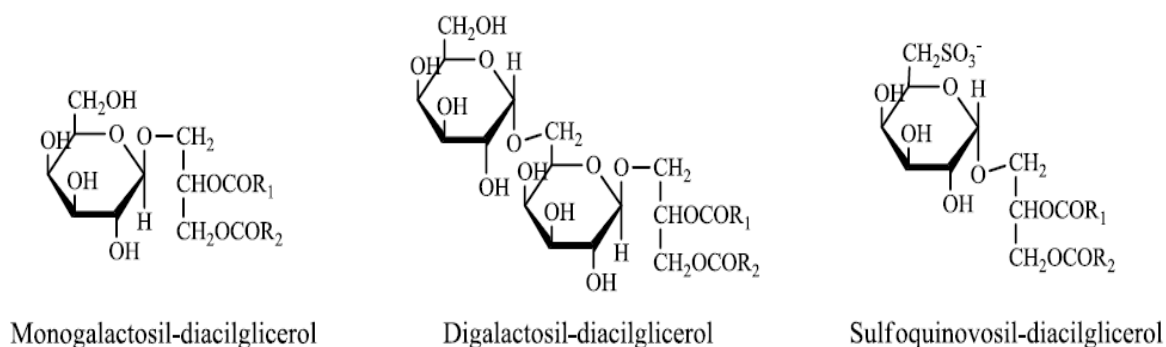


Figura 1.9 - Exemplos de glicerolípidos presentes nas macroalgas castanhas [adaptado [23]].

Relativamente aos terpenos, estes são compostos orgânicos, constituídos por unidades de isopreno (C₅H₈). São biossintetizados por seres procarióticos e eucarióticos, por exemplo, como resposta ao stress ambiental [9]. Contudo os percussores da formação destes compostos é o ácido mevalónico ou mevalonato pela via do mevalonato (MVA) (Figura 1.8), originado pela junção de duas unidades de acetil, CoA, ou de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato pela via desoxixilulose-fosfato (DOXP/MEP). Independentemente da via metabólica utilizada, os produtos finais são o pirofosfato de isopentenilo e o pirofosfato de dimetilalilo. Os isoprenóides obtidos são essenciais para o desenvolvimento, sobrevivência e interação com o ambiente circundante das algas [50].

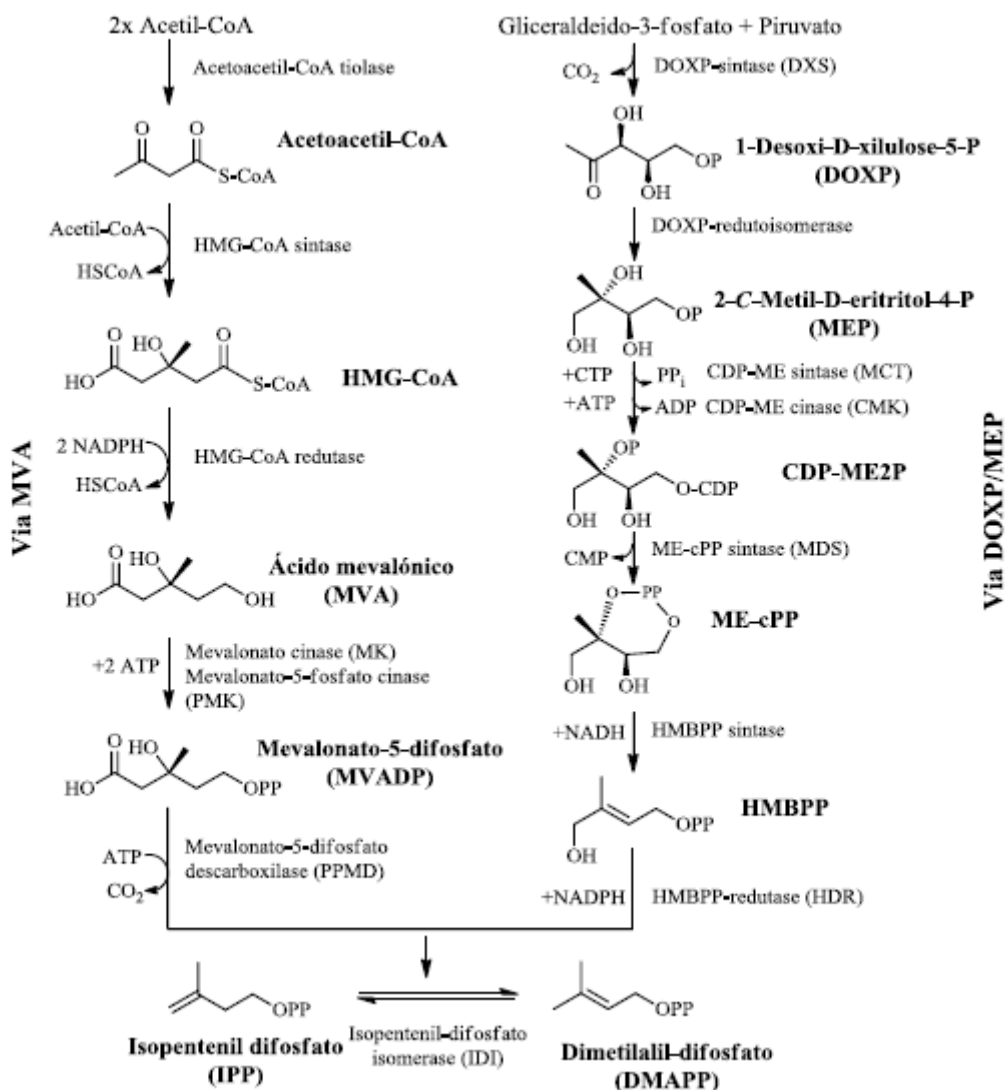


Figura 1.10 - Vias Mevalonato (MVA) e 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato/2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (DOXP/MEP). Abreviaturas da figura: **HMG-CoA**: 3-(S)-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, **CDPME2P**: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato, **ME-cPP**: 2-C-metil-D-eritritol-2,4- ciclo-difosfato, **HMBPP**: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato. [adaptado [50]].

Os terpenos são compostos frequentes nas macroalgas castanhas, particularmente nas espécies da família Dictyotaceae e Sargassaceae. Estas espécies são bastante ricas nestes compostos, especificamente diterpenos (ditiolial, ditiol C e ditiol H) (Figura 1.9). Estes são constituídos por quatro unidades de isopreno (C₂₀), podendo apresentar uma estrutura linear ou policíclica [17], [51].

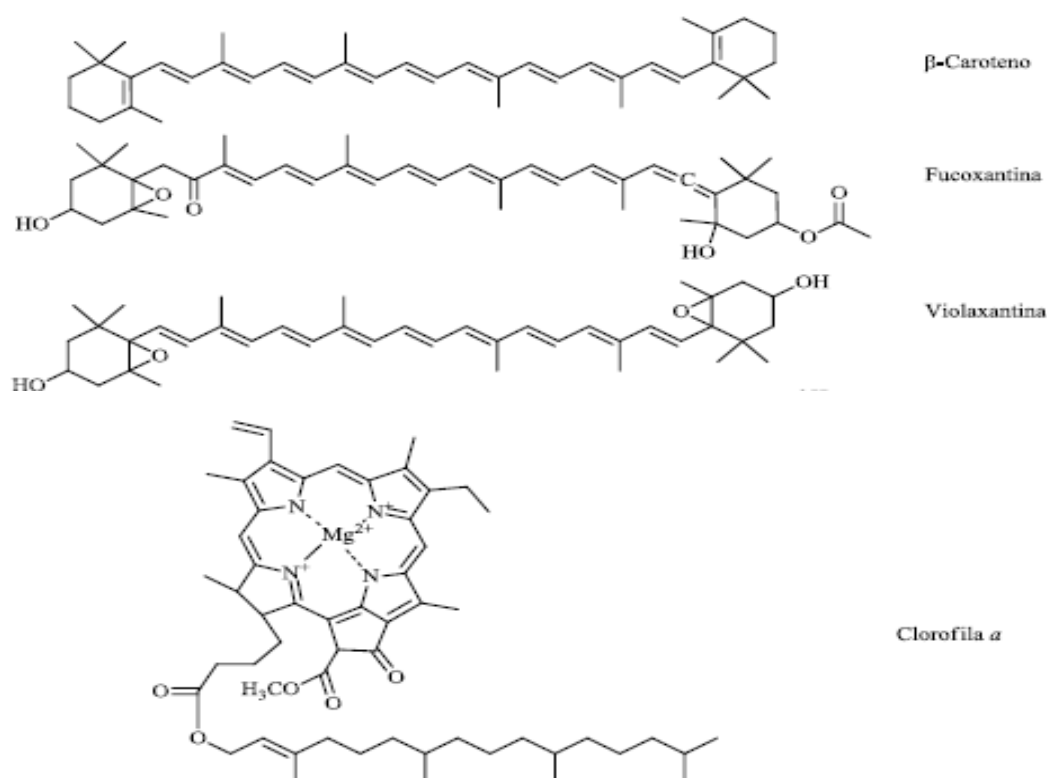


Figura 1.12 - Carotenóides e clorofilas existentes nas macroalgas castanhas [adaptado [5]].

Os esteróis pertencem à família dos esteroides, são componentes estruturais das membranas celulares que regulam a fluidez e a permeabilidade destas, e são encontrados na maioria das células eucariotas. Estes lípidos são também sintetizados pela via do MVA e/ou via DOXP/MEP. Estes compostos são constituídos por um sistema tetracíclico, apresentando um oxigénio (geralmente grupo hidroxilo) na posição C3 e uma cadeia lateral de comprimento variável em C17, podendo apresentar ligações duplas e grupos metilo em diversas posições [9], [52], [53].

Os fitoesteróis, que são os esteroides de origem vegetal, apresentam um grupo alquilo substituinte em C24. O fucosterol é o fitoesterol predominante nas algas castanhas (71-95%). São ainda encontrados o desmosterol, o fucosterol, o ergosterol, o campesterol, o β -sitosterol e o estigmasterol (Figura 1.11) [52]. Os esteróis são nutricionalmente importantes, pois têm atividade anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, antiulcerativa e antitumoral. Uma dieta rica em esteróis vegetais tem ainda demonstrado reduzir os níveis de colesterol no sangue [53].

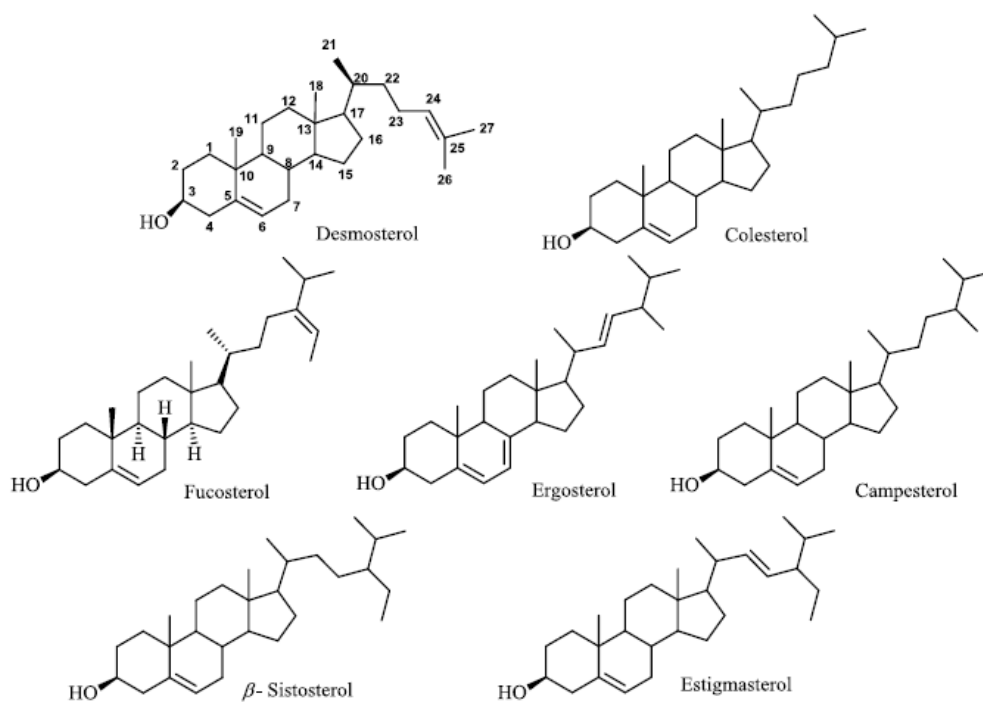


Figura 1.13 - Esteróis encontrados em macroalgas castanhas [adaptado[52]].

1.4.4. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos têm na sua constituição um ou mais anéis aromáticos, com um ou mais substituinte hidroxilo, podem ser monoméricos, oligoméricos ou poliméricos. Estes compostos são amplamente distribuídos no reino vegetal, incluindo ácidos e aldeídos fenólicos, flavonóides e taninos [42], [54]–[56].

Estes compostos desempenham um papel fundamental na estrutura da parede celular e possuem um papel essencial na sinalização e resposta ao *stress* ambiental [55]. Os compostos fenólicos são também responsáveis pelas qualidades nutricionais dos alimentos de origem vegetal. Podem ser classificados consoante o grupo funcional que está ligado ao anel aromático, e essa associação cria compostos que são benéficos para a saúde. São metabolitos secundários derivados da via xiquimato, que resulta da biossíntese de aminoácidos aromáticos, onde os aminoácidos tirosina e fenilalanina são precursores de fenilpropanóides (uma classe de compostos fenólicos) (Figura 1.12) [56]–[58].

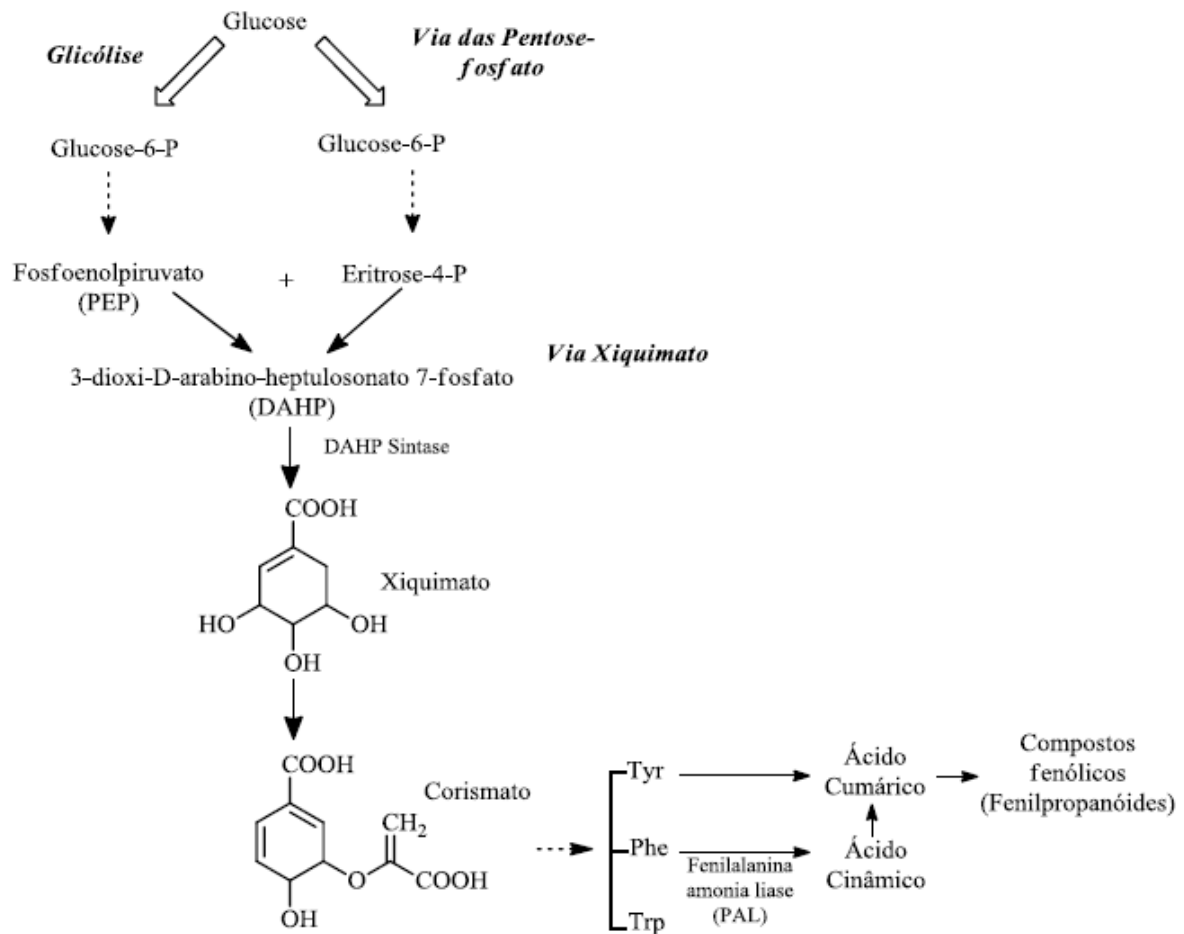


Figura 1.14 - Via xiquimato e síntese de compostos fenólicos pela via fenilpropanóide [Adaptado [58]].

Os aldeídos e ácidos fenólicos são caracterizados por ter um grupo carboxílico ou um grupo aldeído como substituinte principal no anel aromático. Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois subgrupos: os ácidos hidroxibenzoicos, como por exemplo o ácido *p*-hidroxibenzoico, o ácido protocatequínico, o ácido 2,3-di-hidroxibenzoico, o ácido salicílico e o ácido gálico; e os ácidos hidroxicinâmicos, que são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos, que incluem os ácidos ferúlico, 5-hidroxiferúlico, sinapílico, cinâmico, *p*-cumárico, cafeico, entre outros. Existem ainda os aldeídos fenólicos, como exemplo o *p*-hidroxibenzaldeído e o 3,4-di-hidroxibenzaldeído. Estes compostos, já foram identificados em algas marinhas (Figura 1.13) [41], [59], [60].

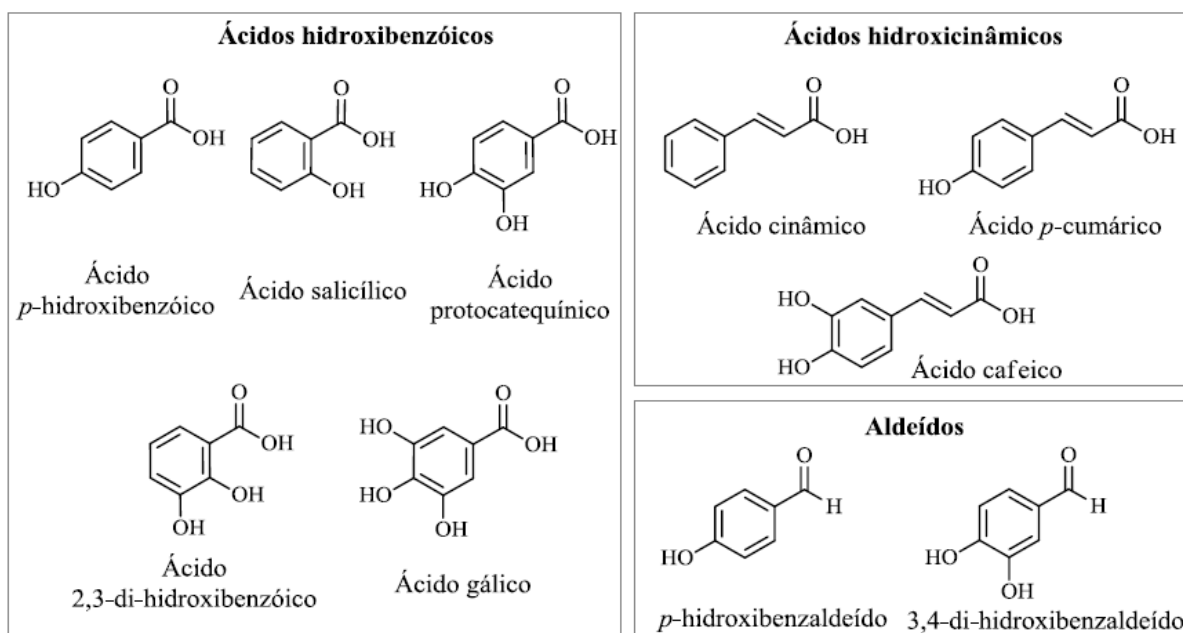


Figura 1.15 - Exemplos de ácidos e aldeídos fenólicos presentes em algas. [adaptado [57]].

Os flavonóides (Figura 1.14) são o maior grupo de compostos fenólicos, apresentando uma estrutura típica constituída por dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos, C6-C3-C6 [55]–[57]. Estes podem ser divididos em diferentes subclasses tendo em conta o seu nível de oxidação e o arranjo da cadeia C3. Se o grupo C3 estiver na forma de anel piranico, os flavonoides serão classificados como flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavan-3-óis e antocianidinas. Se a cadeia C3 estiver aberta, os grupo de compostos fenólicos contém as calconas e as di-hidrocalconas [55]–[57].

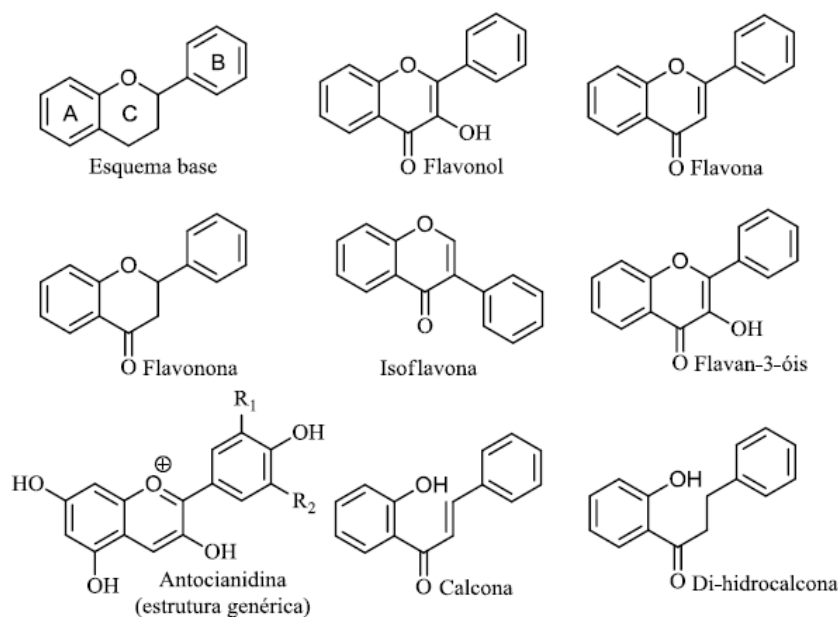


Figura 1.16 - Esquema e estrutura base das diferentes subclasses de flavonóides [Adaptado[57]].

Nas macroalgas castanhas *Himanthalia elongata*, *Laminaria ochroleuca* e *Undaria pinnatifida*, foram detetados alguns flavonoides, como a catequina galato, a epicatequina, a epigalocatequina e a epigalocatequina galato (Figura 1.15) [41].

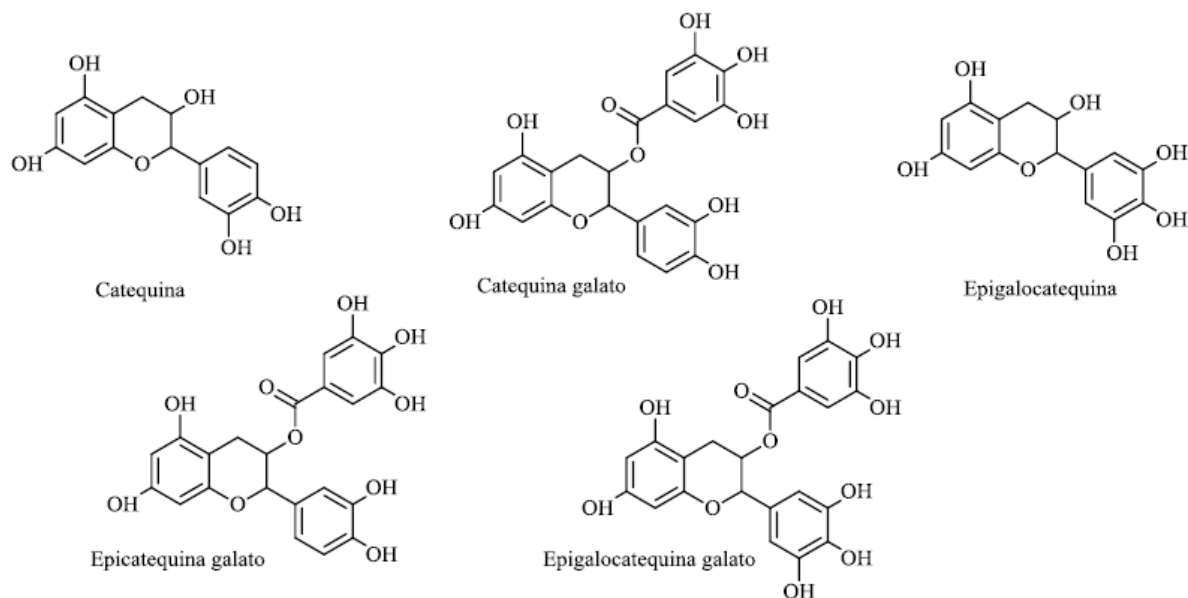


Figura 1.17 - Exemplo de flavonóis identificados em macroalgas castanhas [Adaptado [41]].

Os taninos são o terceiro grupo mais importante de compostos fenólicos com ocorrência natural tanto em plantas terrestres como em plantas marinhas. São classificados em taninos hidrolisáveis, taninos complexos e taninos condensados [57]. Os taninos hidrolisáveis consistem em ésteres de ácido gálico e elágico. Os taninos complexos são compostos por uma molécula de catequina ligada a unidades de galotaninos ou elagitaninos por ligações glicosídicas, enquanto os condensados, também conhecidos por proantocianidinas, têm como precursores os flavonóides, flavan-3-ol (catequina ou epicatequina) e flavano-3,4-diol (leucoantocianidina) [55]–[57].

Nos últimos tempos os florotaninos tem despertado um grande interesse na comunidade científica, são um grupo específico de taninos, derivados de unidades polimerizadas de floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno), muito comum em algas marinhas [61]. O floroglucinol é biossintetizado pela via acetato-malonato, num complexo enzimático que envolve a atividade de duas enzimas, a policétido sintase e a policétido ciclase [9], [39]. Os precursores desta via são o malonil-CoA e o acetil-CoA, que formam um policétido que sofre uma reação de ciclização do tipo de Claisen formando um anel hexacíclico, que não é estável e, portanto, sofre tautomerização para formar floroglucinol, que é termodinamicamente mais estável [9].

Os florotaninos são compostos hidrofílicos, com pesos moleculares que variam entre 126 Da e 650 kDa [37] e são isolados a partir de algas marinhas castanhas, não sendo encontrado em plantas terrestres [42], [61]. São oligômeros ou polímeros de floroglucinol, podendo ser classificados em 6 sub classes, com base nas duas ligações: fucois (ligações arilo-arilo); floretois, hidroxifloretois e fualois (ligações éter); fucofloretois (ligações arilo-arilo e éter) e ecois (ligação dibenzodioxina) [9], [39].

Alguns estudos têm verificado que as algas castanhas são mais ricas em florotaninos do que as outras macroalgas [7], [61]. Na Figura 1.16 estão representados florotaninos isolados de algas castanhas, nomeadamente, na *Ecklonia cava*, *Ecklonia stolonifera*, *Eisenia arborea*, *Eisenia bicyclis*, *Ishige okamurae* e *Ecklonia kurome*. Estes compostos têm sido associados a várias atividades biológicas benéficas para a saúde [37].

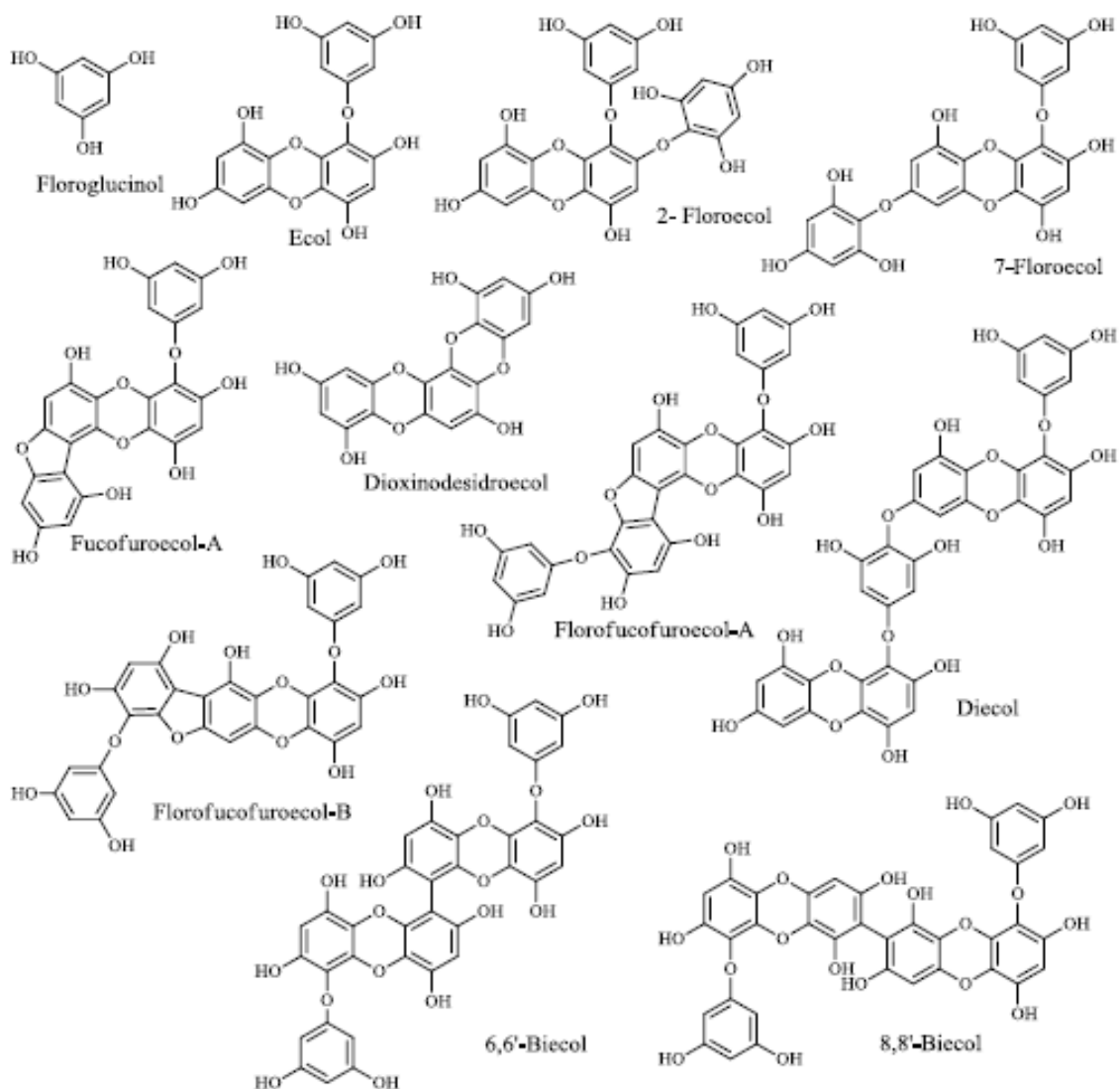


Figura 1.18 - Florotaninos isolados de macroalgas castanhas [Adaptado [37]].

1.5. Extração dos compostos bioativos das macroalgas castanhas

Para a caracterização dos compostos bioativos presentes nas macroalgas a primeira etapa é a sua recolha, seguindo-se a extração desses compostos. Antes da sua extração existe um pré-tratamento que é essencial para evitar a co-extração de outros componentes, com propriedades semelhantes de solubilidade, bem também para garantir que a amostra está limpa e representativa para o estudo [7], [62].

Para a extração é necessário selecionar um solvente extrator, puro ou uma mistura de solventes capaz de extrair de forma eficaz compostos de diferentes polaridades. Os solventes extratores mais utilizados são o hexano, o ciclohexano, o tolueno, o diclorometano, o clorofórmio, a acetona, o metanol, o etanol e a água [63].

Habitualmente, a extração de compostos a partir de amostras sólidas é realizada por extração sólido-líquido. A escolha do método varia de acordo com a natureza dos compostos alvo, de modo a obter o maior rendimento e pureza possível [62]. Com o objetivo de extrair compostos lipofílicos, a extração em Soxhlet tem sido utilizada como uma técnica de referência, pois é uma técnica simples e barata, permitindo obter um alto rendimento de extração e mais elevado comparativamente com outros métodos extrativos [7]. Contudo, com o surgimento de novas tecnologias inovadoras e amigas do ambiente, técnicas como extração com fluidos supercríticos (SFE), extração por micro-ondas (MAE), extração assistida por ultra-sons (UAE), extração acelerada por solvente (ASE) e extração assistida por enzimas (EAE) têm sido utilizadas para extrair compostos bioativos das macroalgas [7], [60], [62], [64]–[68].

A SFE tem sido utilizada para extrair ácidos gordos, carotenóides e clorofilas e β -caroteno das macroalgas [62], [67], [68]. No entanto, o elevado custo do equipamento e a baixa polaridade do fluído limita o seu uso à extração de compostos com baixa polaridade [62].

A MAE tem sido utilizada para extrair compostos bioativos de algas, como os carotenóides e os fucoidanos. Como vantagem destaca-se a melhoria do rendimento de extração e o uso de quantidades menores de solvente. Porém não é adequada para compostos termolábeis [62].

A UAE é compatível com a extração de compostos sensíveis à temperatura, ao contrário a MAE, que para além de ser uma técnica de baixo custo e simples, o uso de ultra-sons na extração sólido-líquido tem ainda como vantagem o aumento do rendimento e da velocidade de extração [62].

A ASE é uma técnica promissora para extrair diferentes famílias de compostos das macroalgas, apesar de utilizar temperaturas elevadas. Alguns estudos descrevem a possibilidade da ASE em extrair carotenóides, clorofilas, ácidos gordos e compostos fenólicos [62], [65], [67].

A EAE é um processo de pré-tratamento das amostras que permite hidrolisar polissacarídeos e proteínas insolúveis em água, tornando-os extratos solúveis, sem recorrer a solventes orgânicos. O custo é relativamente baixo, porque utiliza enzimas tais como a celulase, a α -amilase e a pepsina [62]. A aplicação deste método antes de se efetuar a extração de compostos nas macroalgas permitiu um aumento no rendimento de extração de lípidos totais e da fucoxantina [66].

1.5.1. Atividade antioxidante e antibacteriana

Devido à presença de compostos bioativos na composição das macroalgas castanhas, estas apresentam atividades antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e antifúngica [7]. O facto de as macroalgas estarem expostas a radiações UV origina a formação de radicais livres e outros oxidantes, estimulando assim, a produção de compostos antioxidantes, nomeadamente os florotaninos, para se protegerem dos danos estruturais provocados pelos agentes oxidantes, o que as torna um alvo para a procura de compostos bioativos de origem natural [69].

Relativamente à atividade antioxidante, o stress oxidativo pode ser definido pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e antioxidantes. Quando esse desequilíbrio é atingido, pode existir um aumento na produção de espécies reativas, causando a oxidação e danificar componentes celulares, tais como lípidos, proteínas e ADN. Os antioxidantes são conhecidos como substâncias que retardam ou impedem a oxidação, ou seja, vão criar uma defesa contra os radicais livres que resultam do stress oxidativo. Este processo envolve mecanismos de prevenção e reparação através de substâncias com capacidade antioxidante que podem ser enzimáticas ou não enzimáticas [48].

A atividade antibacteriana promovida pelas macroalgas varia consoante a espécie, o estado fisiológico, a região do talo, os aspetos ambientais, a poluição, as condições de crescimento, a época de colheita entre outros. O potencial antibacteriano das macroalgas é máximo na primavera, provavelmente devido à predominância de alguns compostos bioativos nesse período. Alguns estudos que reportam a avaliação de atividade antibacteriana referem que algas secas processadas a altas temperaturas apresentam zonas de inibição mais amplas para certas bactérias como *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* [36].

1.5.2. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante de extratos naturais e/ou compostos isolados pode ser avaliada facilmente por métodos espectrofotométricos. Os métodos mais utilizados para a sua avaliação *in vitro*, são ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*), TRAP (*total radical-trapping antioxidante parameter*), FRAP (*ferric reducing antioxidante power*), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), entre outros. Destes os ensaios FRAP e DPPH têm sido os mais utilizados nestes estudos [70].

O método DPPH consiste na redução do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) pela amostra em estudo. Este método é bastante sensível e simples, em que um dador de hidrogénio é um antioxidante. A molécula de DPPH[•] é caracterizada como sendo um radical livre estável, disponível comercialmente, solúvel em solventes orgânicos. Apresenta uma coloração violeta que se deve à deslocação do eletrão desemparelhado ao longo de toda a molécula, esta é caracterizada com um máximo de absorção UV a 517 nm. A medição da atividade antioxidante é realizada reduzindo o DPPH a hidrazina (Figura 1.17), havendo mudança na coloração de violeta para amarelo. Este método apresenta sensibilidade a alguns parâmetros, como exemplo, a exposição à luz, ao oxigénio, o pH e o tipo de solvente [70]–[72].

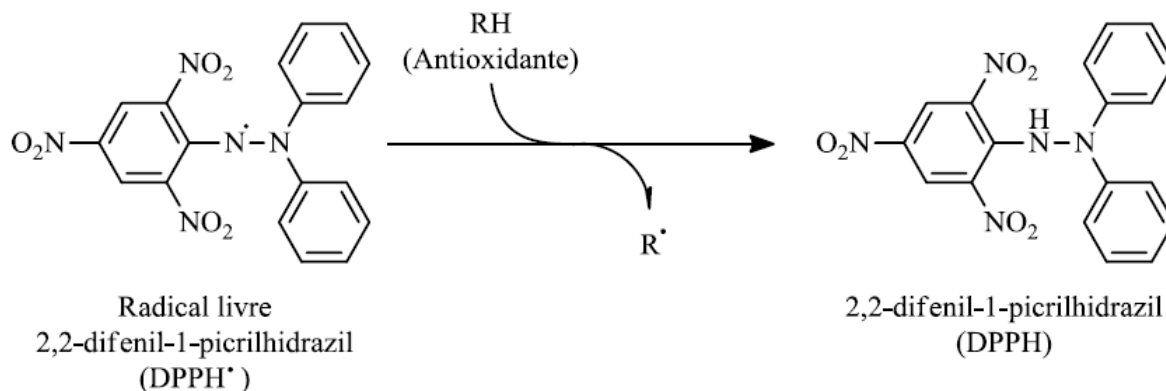


Figura 1.19 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH e compostos antioxidantes. [adaptado [70]].

O método FRAP foi desenvolvido para quantificar o ácido ascórbico no soro ou plasma [70]. Quando o complexo Fe³⁺-TPTZ é reduzido à forma Fe²⁺-TPTZ por um antioxidante sob condições ácidas, desenvolve uma cor azul intensa com absorção máxima a 593 nm (Figura 1.18). Assim o efeito antioxidante é avaliado pela formação do complexo Fe²⁺-TPTZ com auxílio de um espectrofotómetro. Os resultados são rápidos e reproduzíveis, deve ser utilizado um antioxidante de referência solúvel em água, como exemplo, ácido ascórbico, ácido úrico ou Trolox [70]–[72].

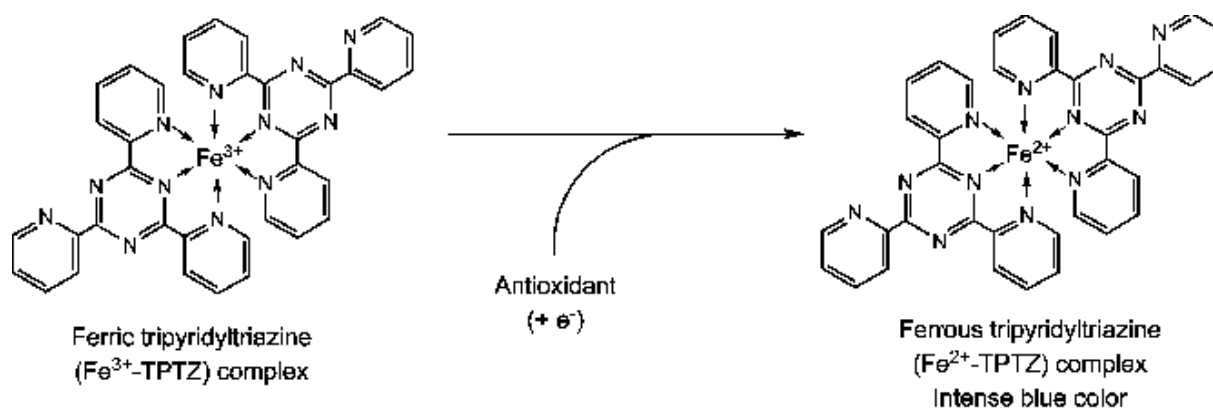


Figura 1.20 - Formação do complexo Fe²⁺ - TPTZ a partir do complexo Fe³⁺ - TPTZ por um antioxidante [Adaptado [70]].

1.6. Bactérias usadas no estudo da capacidade antimicrobiana das macroalgas castanhas

Os compostos contidos nas macroalgas castanhas apresentam inúmeras atividades benéficas à saúde. As capacidades antimicrobianas dos extratos de algas foram analisadas com sucesso contra vários agentes patogênicos de grande preocupação para a saúde humana. Algumas das bactérias Gram positivas estudadas são estirpes de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ou *Micrococcus luteus*, enquanto as bactérias Gram negativas analisadas incluem *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* ou *Vibrio cholerae* [73]. O mecanismo de ação está associado aos compostos extraídos das algas marinhas. Esses incluem mudanças que ocorrem na permeabilidade das membranas, graças à interação com proteínas e lípidos neles presentes, ou a capacidade de inibir enzimas [74], [75]. Os florotaninos, laminaria, sargafurano, ácido peisonóico, bromoficolídeos, neurmenolidos, acetilmajapoleno e ficobiliproteínas, fitol, fucosterol, neofitadieno, ácidos palmítico, palmitoléico e oleico, são alguns exemplos dos compostos específicos extraídos das macroalgas que mostraram função antimicrobiana [6].

1.6.1. *Escherichia coli*

As bactérias da espécie *E. coli* são Gram-negativas e pertencem à família das Enterobacteriaceae. As células têm a forma de bacilococcus e podem ser imóveis ou móveis por flagelos. As estirpes de *E. coli* podem ser diferenciadas com base nos antigênios somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K). Adicionalmente, a presença de fímbrias e de outras estruturas relacionadas desempenha um papel importante na virulência da bactéria [76]. Esta

bactéria cresce preferencialmente à temperatura de 37 °C. A *E. coli* pode estar presente no trato gastrointestinal e ser inofensiva, como também causar diarreia e outras doenças intestinais [6].

As variantes da *E. coli* causam um número significativo de mortalidade em todo mundo, sendo que a principal fonte da bactéria é via alimentar. A maioria dos casos de surtos de origem alimentar estão associados à ingestão de alimentos contaminados por *E. coli*. De acordo com a literatura, extratos de macroalgas castanhas das espécies *Scytosiphon lomentaria* e *Padina pavonica* inibiram o crescimento do serotipo de *E. coli* O157:H7 [6].

1.6.2. *Salmonella enteritidis*

A *Salmonella* é uma bactéria Gram-negativa que pertence à família Enterobacteriaceae. As células têm a forma de bastonetes (bacilos) imóveis ou móveis por flagelos. A salmonelose é uma doença de distribuição mundial e ocorre em humanos e animais. Os animais são os principais reservatórios da doença, sendo que esta é transmitida pelos alimentos, embora também possa ser transmitida de pessoa para pessoa. Os surtos de intoxicação alimentar por *Salmonella* são frequentes em todo mundo [6].

1.6.3. *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, baciliforme e aeróbia. Esta bactéria encontra-se no solo, mas é capaz de sobreviver em ambientes mais hostis como a água, a flora da pele entre outros. Este patogénico pode causar doenças humanas como osteomielite, endocardite, pneumonia, meningite, septicemia e infeções do trato urinário e gastrointestinais. Existem dados que mostram que em alguns países as pessoas estão a ter resistência a antibióticos, pelo facto das *Pseudomonas* estarem a evoluir e tornarem-se mais resistentes [6].

1.6.4. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva pertencente à família Micrococcaceae. As células têm a forma de cocos, anaeróbias facultativas e apresentam-se frequentemente agrupados em cacho e são imóveis. Quando em condições favoráveis, produz toxinas – enterotoxinas – que são o agente responsável pela intoxicação alimentar. Estas toxinas são proteínas hidrossolúveis e termorresistentes, mantendo a sua atividade mesmo após a pasteurização. A destruição da enterotoxina obtém-se pelo tratamento a 100°C durante pelo menos 30 minutos. A ingestão de uma toxina pré-formada em alimentos contaminados com este microrganismo causa intoxicações alimentares [6].

O *S. aureus* é a principal causa de gastroenterite, mas a contaminação pode ser facilmente evitada por tratamento térmico de alimentos. A população humana (30-50%) é portadora desta bactérias, ou na pele ou no cabelo de animais de sangue quente, logo esta bactéria tem uma resistência notória a vários antibióticos [6].

1.6.5. *Bacillus cereus*

B. cereus é uma bactéria Gram-positiva pertencente à família Bacillaceae. As células têm a forma de bacilos, geralmente móveis, e formam esporos, aeróbica. A *B. cereus* produz 2 tipos de enterotoxinas, a diarreica e a emética (induz o vômito), que são os agentes responsáveis pela intoxicação alimentar. A toxina diarreica é uma proteína produzida durante o crescimento das células. A toxina emética é um pequeno peptídeo sem propriedades antigénicas, produzido durante a fase estacionária do crescimento e extraordinariamente resistente ao calor, a pH extremos e à digestão enzimática. As intoxicações causadas por *Bacillus cereus* resultam da ingestão de alimentos contaminados com o microrganismo e/ou com as enterotoxinas que produziu durante o seu crescimento. As intoxicações associadas a este microrganismo são normalmente de curta duração e pouco severas. Têm, no entanto, sido relatados diversos surtos e casos esporádicos [6], [77].

Esta bactéria é um agente patogénico frequentemente difundido no solo e em plantas em crescimento, no entanto também é capaz de crescer no trato intestinal de insetos e mamíferos. A partir desses habitats, é facilmente disseminado para os alimentos, onde pode causar um tipo de toxina emética ou diarreica [6].

1.6.6. *Staphylococcus epidermidis*

A *S. epidermidis* é uma espécie de bactéria Gram-positiva, em forma de cachos e tétrades e caracterizada por ser coagulase negativa. Foi considerada uma bactéria comensal, porém sabe-se que é um patogénico oportunista, responsável por infeções hospitalares, através dos materiais de plástico, bem como próteses, devido à sua capacidade de formar biofilmes. As patologias associadas a esta bactéria podem causar, endocardite, pústulas de acne, furúnculo abcessos, entre outras associadas ao estado de imunossupressão [78].

2. Objetivos

A costa norte da Península Ibérica possui uma zona económica exclusiva bastante extensa, sobre a qual têm sido criadas várias estratégias, de forma a impulsionar um desenvolvimento económico baseado no conhecimento, na exploração sustentável e num uso mais eficiente dos recursos marinhos. A biotecnologia marinha tem sido um dos setores com maior crescimento, destacando-se a exploração de organismos marinhos como uma fonte de compostos de valor acrescentado, em particular de compostos biologicamente ativos. De facto, atualmente tem existido um elevado interesse neste tipo de compostos, que devido às suas diversas propriedades apresentam várias aplicações a nível industrial, nomeadamente a indústria farmacêutica, cosmética, alimentar, entre outras [7].

Dentro dos recursos marinhos, as algas, embora sejam utilizadas na alimentação e como remédios tradicionais há vários séculos, são ainda pouco explorados na Península Ibérica, apesar de haver alguns estudos com bons indicadores, que demonstram que estas podem ser uma fonte promissora de compostos bioativos.

A elevada diversidade de espécies de algas presentes na costa norte da Península Ibérica aliada à elevada variabilidade que estas apresentam na sua composição, fez com que mais estudos tenham que ser feitos para a valorização destes recursos.

Por isso, o objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade de extratos de nove espécies de macroalgas castanhas (*Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata*, *Pelvetia canaliculata*, *Saccharina latíssima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Laminaria ochroleuca*, *Sargassum muticum*, *Fucus spiralis*, *Ascophyllum nodosum*) existente na costa norte da Península Ibérica, em inibir o crescimento de alguns dos principais agentes patogénicos responsáveis por distúrbios alimentares. Isto é, as propriedades biológicas serão avaliadas através da medição da atividade antibacteriana *in vitro* contra vários microrganismos (nomeadamente, *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus* e *S. epidermidis*).

Também se pretende avaliar o teor em composto antioxidantes dos extratos destas algas através da determinação do teor fenólico total (TPC), do teor flavonoides totais (TFC) e da determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro (do inglês FRAP) e pelo DPPH-RSA.

De modo a estudar a influência da natureza dos solventes extratores na eficácia na extração de compostos bioativos das macroalgas castanhas foram utilizados cinco solventes orgânicos diferentes: etanol (EtOH), clorofórmio (CHI), hexano (Hex), acetona (AcO) e acetato de etilo (AcET).

3. Materiais e Métodos

3.1. Preparação dos extratos de macroalgas

3.1.1. Amostragem e preparação das amostras

As macroalgas utilizadas na realização deste estudo foram cedidas pela empresa ALGAMAR, sendo que a sua colheita foi realizada entre janeiro e março de 2020.

As algas coletadas foram limpas exteriormente com água desionizada para a remoção de impurezas, como areias, pulgas, entre outros. Seguidamente foram conservadas no congelador a -20 °C. As amostras foram liofilizadas, porém uma hora antes foram colocadas no congelador a -80 °C para facilitar a técnica. Após a liofilização, as algas foram moídas até se obter um pó fino e foram reservadas em tubos *falcon* no congelador.

3.1.2. Extração sólido-líquido

Pesou-se 0,600 g de cada amostra para frascos de âmbar, adicionou-se 20 mL de cada solvente (etanol-EtOH, clorofórmio-CHl, hexano-Hex, acetona-AcO e acetato de etilo-EtAc) e deixou-se 24 h em agitação, a 15 rpm a 50 °C. O sobrenadante foi vertido para um novo tubo *falcon*, e foi adicionado novamente 10 mL do mesmo solvente a cada amostra, nas mesmas condições de agitação durante 1 hora. Este passo foi repetido por uma segunda vez, nas mesmas condições, com a intenção de retirar uma maior quantidade de compostos bioativos da alga. Por fim, depois de recolhido o último sobrenadante para os tubos iniciais, foi necessário centrifugar a amostra, para separar o depósito do solvente, em que este último fica limpo e pronto a ser vertido para novos tubos *falcon*. Por fim, 5 mL destas amostras foram secas num evaporador, REACTI-THERM III #TS-18823, de modo a ficar apenas no tubo o extrato seco da amostra a analisar, Figura 3.1.



Figura 3.1 - Evaporador REACTI-THERM III #TS-18823 e exemplo de um extrato seco.

3.2. Análise Química e Biológica

3.2.1. Avaliação do teor em compostos fenólicos e atividade antioxidante

Na avaliação de conteúdos em compostos fenólicos e flavonoides e atividade antioxidante presentes nos vários extratos das nove macroalgas castanhas foram utilizados quatro métodos analíticos, TPC, TFC, DPPH-RSA e FRAP. Para execução laboratorial destes métodos foi utilizado um espectrofotómetro de microplacas, Multi Mode Microplate Reader with Gen5 2.0 software (BioTek Instruments, USA) (Figura 3.2).



Figura 3.2 - Leitor de microplacas *Multi Mode Microplate Reader with Gen5 2.0 software* (BioTek Instruments, USA).

No método TPC foi utilizado o reagente Folin – Ciocalteu e o antioxidante padrão foi o ácido gálico (AG). O reagente de Folin-Ciocalteu é constituído por uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato e tem como função reduzir os antioxidantes fenólicos e polifenólicos existentes numa amostra.

No ensaio TFC, o padrão antioxidante utilizado foi a (-) - epicatequina. No FRAP, o padrão antioxidante foi ácido ascórbico e o reagente FRAP (constituído por tampão acetato, TPTZ e $\text{FeCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). No método DPPH-RSA o padrão antioxidante utilizado foi Trolox (análogo da vitamina E) e o radical reagente DPPH $^{\bullet}$.

3.2.2. Determinação do TPC (*Total phenolics content*)

OTPC foi determinado por um ensaio colorimétrico baseado na reação do reagente de Folin-Ciocalteu, com os fenóis presentes na amostra, produzindo um produto azul estável. Este ensaio consiste em efetuar uma mistura reacional composta por 25 μL de amostra/padrão/água desionizada, 75 μL água desionizada e 25 μL de reagente Folin – Ciocalteu (diluído com água na proporção de 1:1). Após 6 minutos, ao abrigo da luz, adicionou-se 100 μL de Na_2CO_3 (75 g L^{-1}). Após a incubação de 90 minutos, ao abrigo da luz, e à temperatura ambiente, a absorvância

das amostras foi medida a 765 nm, no leitor de microplacas. As curvas de calibração foram realizadas na gama de concentrações de ácido gálico (antioxidante padrão) entre 15,0 a 300,0 mg L⁻¹[71]. De acordo com Miller and Miller (2005) o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foi calculado (curva de calibração: $abs = 6.97 \times 10^{-3} \times mg\ L^{-1} + 9.66 \times 10^{-3}$; R=0,998; LOD= 1.18 mg L⁻¹; LOQ= 3.94 mg L⁻¹). Os resultados de TPC obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extrato (mg EAG/g extrato). os ensaios foram realizados em triplicado (Figura 3.3).

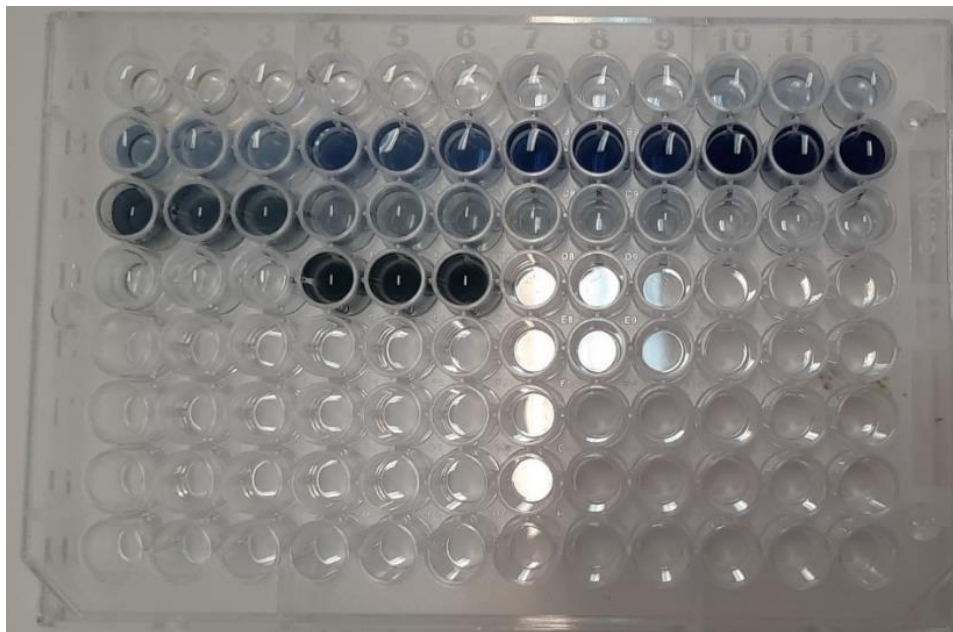


Figura 3.3 - Exemplo de uma microplaca com o ensaio TPC.

3.2.3. Determinação do TFC (*Total flavonoids content*)

O TFC foi determinado por um método colorimétrico baseado na formação de compostos alumínio-flavonoides. O protocolo experimental da determinação de TFC em amostras consiste em colocar uma mistura de reação na microplaca contendo 100 µL água ultrapura, seguidos de 25 µL amostra/padrão/água ultrapura e 10 µL NaNO₂ (50 g/L). Após 5 minutos foi adicionado 15 µL AlCl₃ (100 g/L) e após 1 minuto da reação adicionou-se 50 µL NaOH (1 M). Para finalizar utilizou-se (-) - epicatequina como padrão antioxidante e foi lida a absorvância no leitor de microplacas a 593 nm [71]. Os resultados do TFC obtidos foram expressos em mg de equivalentes de epicatequina (EEPI) por g de extrato (mg EEPI/g de extrato), todos os ensaios foram realizados em triplicado (Figura 3.4).

As curvas de calibração foram efetuadas com soluções aquosas de epicatequina na gama de concentrações de 15.0 a 300 mg /L (curva de calibração: $abs = 6.97 \times 10^{-3} \times mg\ L^{-1} + 9.66 \times$

10^{-3} ; $R=0,998$). De acordo com Miller and Miller (2005) o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados, tendo-se obtidos valores de 1.13 mg/L e 3.75 mg/L, respectivamente.

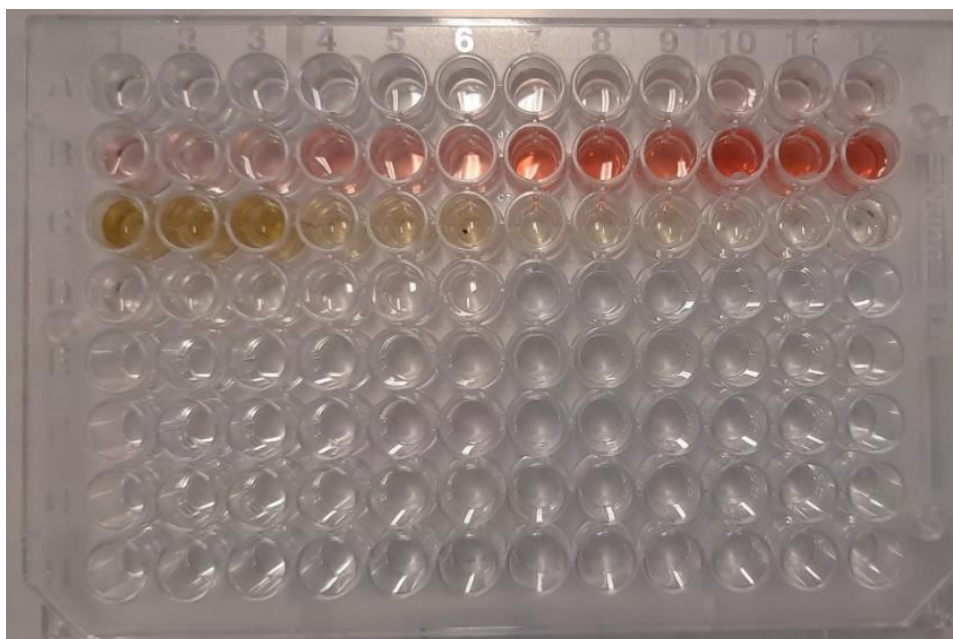


Figura 3.4 - Exemplo de uma microplaca com o ensaio de TFC.

3.2.4. DPPH[•]-RSA (*radical scavenging activity*)

A avaliação da atividade antioxidantes das amostras através do método DPPH-RSA foi determinado espectrofotometricamente a 517 nm. Para isso numa microplaca foram misturados 25 μ L da amostra/padrão com 200 μ L da solução etanólica de DPPH[•] (40 mg/L). A mistura, vigorosamente agitada, foi deixada em repouso durante 30 minutos, ao abrigo da luz (para estabilizar os valores de absorção), até ser efetuada a medição. Valores mais baixos de absorvância da mistura reativa indicam maior atividade de eliminação de radicais livres. A curva de calibração foi preparada com soluções etanólicas de Trolox [71] numa gama de concentrações a variar entre 20,0 a 200,0 mmol de Trolox L^{-1} , tendo sido obtido a seguinte linearidade: $abs = -1,57 \times 10^{-3} \times \mu\text{mol } L^{-1} + 8,54 \times 10^{-1}$; $R=0,995$; $LOD = 4,23 \mu\text{mol } L^{-1}$ e $LOQ = 14,1 \mu\text{mol } L^{-1}$. Os valores de DPPH-RSA calculados foram expressos em mg de equivalentes de trolox / grama de extrato seco (mg ETR/g extrato). Todos os ensaios foram realizados em triplicado (Figura 3.5).

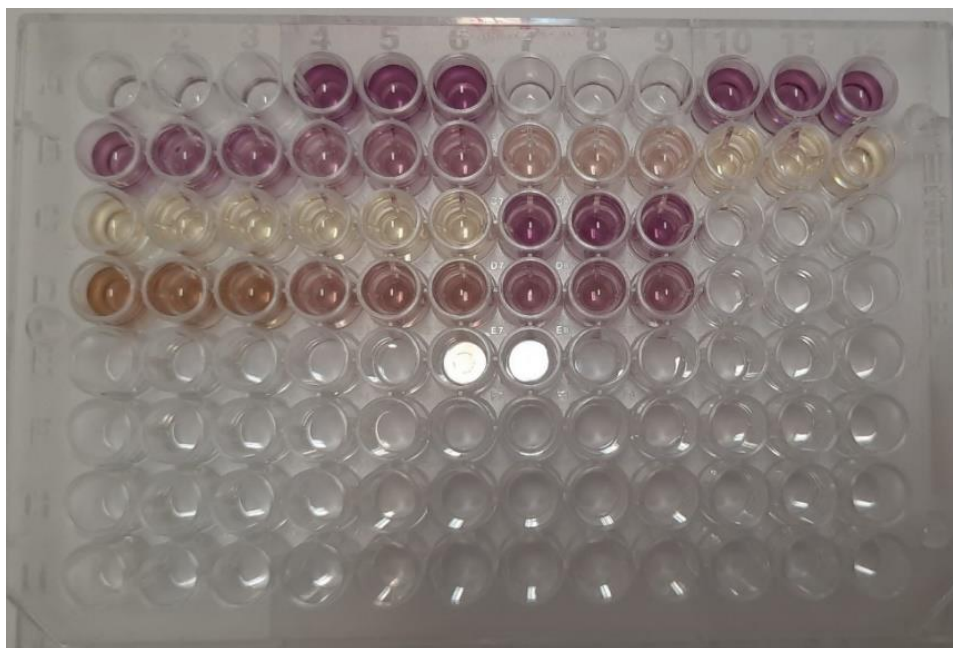


Figura 3.5 - Exemplo de uma microplaca com o método DPPH.

3.2.5. FRAP (*Ferric reduction activity power*)

A determinação da capacidade das amostras em reduzir o ferro, sob um pH ácido, é determinada através do ensaio FRAP (Fe^{2+} -2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine). De modo a descobrir se o reagente DMSO (usado para dissolver as amostras liofilizadas) interferia na determinação do FRAP foi necessário proceder a uma alteração no protocolo experimental do método FRAP. Nesse sentido, prepararam-se dois reagentes FRAP, em que um reagente continha 1 mL de DMSO e o outro não continha DMSO. O reagente FRAP continha tampão acetato (300 mmol/L), TPTZ (300 mmol/L) e $\text{FeCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (20 mmol/L) (proporção de 10:1:1, respetivamente). Utilizaram-se três controlos, um constituído por 200 μL de água desionizada, um segundo com 20 μL de água desionizada e 180 μL de reagente FRAP com DMSO e por fim 20 μL de DMSO e reagente FRAP (este sem DMSO). Estes controlos foram realizados em triplicado. O ensaio FRAP consistiu em adicionar na microplaca 180 μL do reagente FRAP com DMSO e posteriormente 20 μL da amostra/padrão. Posteriormente, as microplacas foram revestidas com alumínio e dispostas numa incubadora a 37 °C durante 1h 30 min. A absorvância foi medida a 593 nm e a curva de calibração foi obtidas para soluções de ácido ascórbico de concentrações a variar entre 5,00 a 100,0 mg /L. A curva de calibração obtida foi, $\text{abs} = 1,43 \times 10^{-2} \times \text{mg L}^{-1} + 5,20 \times 10^{-4}$, $R=0,998$, $\text{LOD}= 1,63 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{LOQ}=5,00 \text{ mg L}^{-1}$. Os valores de FRAP foram expressos em mg de equivalentes de ácido ascórbico / grama de extrato seco (mg EAA/g extrato). Todos os ensaios foram realizados em triplicado (Figura 3.6).

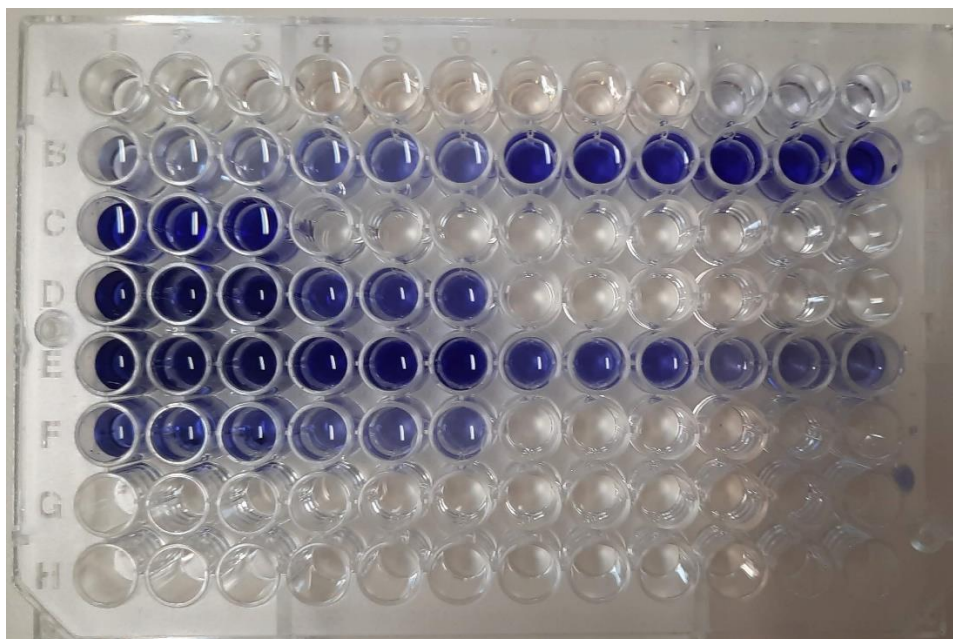


Figura 3.6 - Exemplo de uma microplaca com o método FRAP.

3.2.6. Avaliação da capacidade antimicrobiana

Para efetuar a avaliação da capacidade antimicrobiana, os extratos secos das macroalgas castanhas foram dissolvidos em 2 mL de DMSO. De modo a garantir a total dissolução das amostras quando necessário foi utilizado um vortex e ultrassons. Posteriormente, fez-se passar a amostra por filtros de seringa com poro de 0,45 µm por forma a tornar as amostras estéreis.

As a bactérias a serem usadas nos ensaios da atividade antimicrobiana foram inoculadas em Mueller Hinton Broth e colocadas em crescimento durante 12 a 16 h a 37 °C. A partir desta cultura mãe, procedeu-se à normalização do número inicial de unidades formadoras de colónias. Para tal, recorreu-se à leitura da turbidância da cultura num espectrofotómetro, *SHIMADZU UV-Visible Recording Spectrophotometer UV-160A*, procedendo-se à diluição necessária para o ajuste da leitura da absorvância, com a finalidade de obter um valor entre 0,090 e 0,110 no comprimento de onda de 600 nm. Este valor de absorvância correspondente a uma turvação à escala de 0,5 de McFarland, conduzindo a um valor aproximado de 1 a 5×10^8 células/mL [71]. A atividade antimicrobiana dos extratos das macroalgas castanhas foi testada contra as seguintes estirpes de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Bacillus cereus* (ATCC 14579); *Staphylococcus epidermidis* (NCTC 11047) e Gram-negativos: *Escherichia coli* (NCTC 9001); *Salmonella enteritidis* (ATCC 13676); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145).

Na preparação das placas de Petri utilizadas nos ensaios, foram colocados 50 μL da bactéria. De modo que as bactérias ficassem uniformemente distribuídas sobre o meio de cultura *Mueller Hinton II Agar* presente na superfície da caixa de Petri utilizou-se um espalhador estéril em forma de T (VWR). Usando-se um marcador, as placas foram divididas em quatro quadrantes, Figura 3.7, em três dos quadrantes foram colocados 15 μL de cada extrato da macroalga castanha (triplicado) e no quarto quadrante 15 μL de ácido láctico a 40 % (V/V) (controlo positivo). Por fim no meio da placa colocou-se DMSO como controlo negativo. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A inibição do crescimento das bactérias promovida pelos extratos das algas foi visualizada através da formação de zonas circulares de inibição do crescimento das bactérias. O diâmetro destas zonas de inibição do crescimento ou halos de inibição foi medido através de um paquímetro digital, *Mitutoyo Digimatic Caliper*. O processo de preparação de placas de Petri, a sua incubação na estufa e todo o trabalho laboratorial foi realizado numa câmara de fluxo laminar, para garantir a esterilidade do processo.

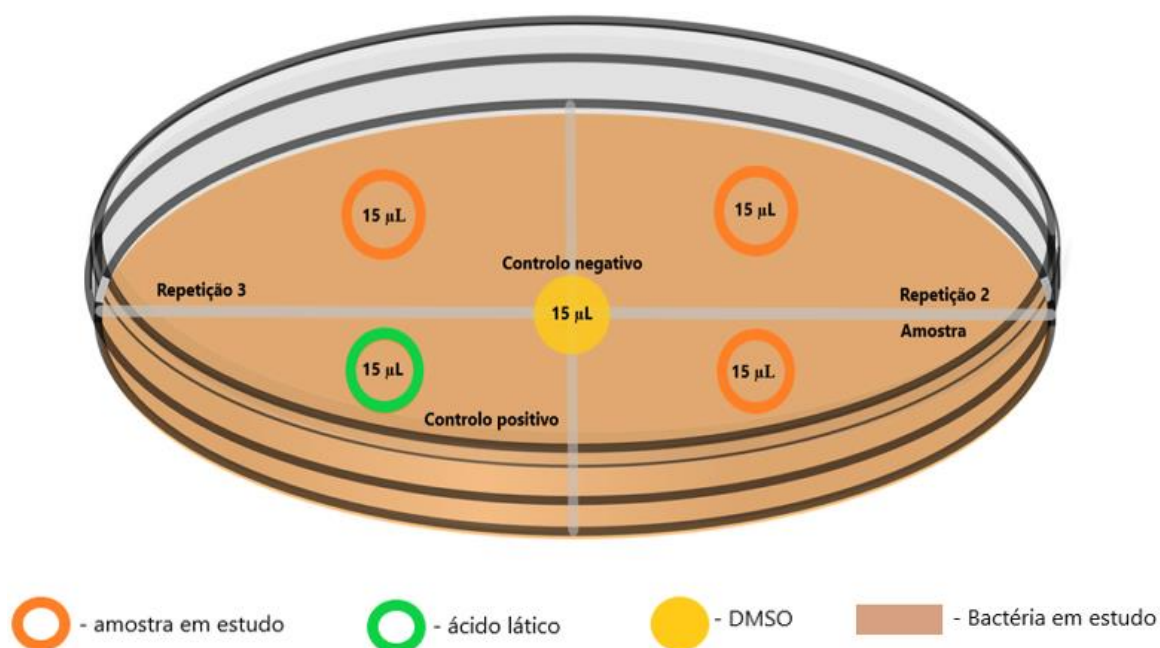


Figura 3.7 - Ilustração da organização das placas de Petri deste estudo para avaliação da atividade antimicrobiana.

4. Resultados e discussão

Sendo o objetivo principal deste trabalho estudar a capacidade das macroalgas em inibir o crescimento de alguns dos principais agentes patogênicos responsáveis por distúrbios alimentares determinou-se o teor de compostos bioativos e as propriedades biológicas de extratos de nove espécies diferentes de macroalgas castanhas (*Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata*, *Pelvetia canaliculata*, *Saccharina latissima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Laminaria ochroleuca*, *Sargassum muticum*, *Fucus spiralis*, *Ascophyllum nodosum*).

A determinação da composição em compostos bioativos dos extratos de algas foi realizada avaliando-se o perfil antioxidante por meio da determinação do teor fenólico e flavonoides total (TPC, TFC) e da determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro (do inglês FRAP) e DPPH•-RSA. Por outro lado, as propriedades biológicas foram avaliadas através da medição da atividade antibacteriana *in vitro* contra vários microrganismos (nomeadamente, *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus* e *S. epidermidis*).

O rendimento da extração depende da técnica de extração selecionada, do tempo e da temperatura, bem como do tipo de solventes de extração e da composição química da amostra de macroalgas. Usando a mesma técnica de extração e as mesmas condições de tempo e temperatura, a natureza do solvente e as propriedades químicas da amostra são os dois fatores mais importantes. O rendimento de extração (%) foi calculado de acordo com a equação 4.1, em que P2 é o peso do cadinho mais a amostra seca, P1 peso do cadinho e P0 peso inicial da alga.

$$\text{Rendimento de extração (\%)} = \frac{P2 - P1}{P0} \times 100 \quad \text{Equação 4.1}$$

Os rendimentos obtidos para cinco extratos diferentes de nove espécies de macroalgas marrons foram avaliados e estão apresentados na Tabela 4.1. Como é possível observar, o rendimento de extração foi fortemente dependente da natureza do solvente. O maior rendimento para todos os extratos das nove macroalgas castanhas foi obtido quando o EtOH foi usado como solvente de extração. Os rendimentos de extração variaram de 14,6 a 38,8% s quando EtOH foi usado como solvente de extração.

4.1. Avaliação do teor em compostos fenólicos e atividade antioxidante

A riqueza de compostos bioativos nas macroalgas castanhas, como por exemplo, antioxidantes e a sua atividade antimicrobiana, fez com que estas tivessem recebido bastante atenção a nível da investigação. No entanto, foi possível verificar que o teor de compostos

bioativos nos extratos varia de acordo com o método de extração aplicado, sendo que a seleção do solvente pode ser crítico, uma vez que uma extração eficiente depende do solvente de extração [79], [80]. Por outro lado, na seleção do solvente, é necessário considerar a sua polaridade, a sua segurança e também a proteção ambiental.

Nesta dissertação, 0,6 g de macroalgas foram utilizadas numa extração sólido/líquido convencional, utilizando-se cinco solventes diferentes: EtOH, AcO, AcET, Hex e CHI. A partir dos extratos obtidos avaliou-se rendimento de extração, conteúdo em compostos fenólicos totais, atividade antioxidantes e antimicrobiana.

4.1.1. Determinação por TPC (Total phenolics content)

Os compostos fenólicos associados à atividade antioxidante, parecem ter um papel importante na estabilização da oxidação lipídica. Normalmente, o mecanismo antioxidante dos compostos fenólicos é a inativação dos radicais livres lipídicos e a prevenção da decomposição dos hidroperóxidos em radicais livres. O facto de os compostos fenólicos pertencerem a uma grande família de substâncias com diferentes composições e estruturas, tanto hidrossolúveis quanto lipofílicas, faz com que os procedimentos de extração tenham uma variação considerável.

As determinações dos valores de TPC devem ser consideradas como indicativos de compostos fenólicos. Neste método existe algumas interferências devido à presença de açúcares redutores e alguns aminoácidos nos extratos e que podem sobrestimar as determinações experimentais efetuadas [15].

A quantificação do teor de fenóis totais (TPC) foi determinada pelo método Folin-Ciocalteu, sendo que os resultados obtidos estão da Tabela 4.1. Os valores de TPC variaram de 2,07 mg GAE/g (*Pelvetia canaliculata* extraída com Hex) a 211,83 mg GAE/g (*Ascophyllum nodosum* extraído com AcET).

Após a análise dos resultados (Tabela 4.1) é possível afirmar que todos os extratos apresentaram diferenças significativas nos valores de TPC quer entre as diferentes espécies de algas quer entre os diferentes solventes usados na extração. Esta diferença nos valores de TPC deve-se a vários fatores como a espécie da macroalga, idade, localização geográfica e estação o ano que afetam as variações no perfil fitoquímico das algas castanhas. Além disso, de acordo com a literatura, as algas castanhas apresentam maior teor fenólico do que as algas verdes e vermelhas [15], [54], [81]–[83].

Os valores de TPC obtidos nos extratos da alga *Undaria pinnatifida* variaram entre 3 e 42 mg de GAE/g de extrato, na alga *Himanthalia elongata* de 6 a 163 mg de GAE/g de extrato, na alga *Pelvetia canaliculata* variou de 2 a 87 mg de GAE/g de extrato, na alga *Sacharina latissima* de 2 a 16 mg de GAE/g de extrato, na alga *Bifurcaria bifurcata* de 11 a 86 mg de GAE/g de extrato, na alga *Laminaria ochroleuca* de 2 a 33 mg de GAE/g de extrato, na alga *Sargassum muticum* de 8 a 42 mg de GAE/g de extrato, a alga *Fucus spiralis* variou de 10 a 185 mg de GAE/g de extrato e por fim na alga *Ascophyllus nodosum* de 6 a 212 mg de GAE/g de extrato.

Comparando os valores de TPC, os maiores teores foram obtidos nos extratos de *A. nodosum* (117,2 a 211,83 mg GAE/g de extrato) e os menores valores nos extratos de *S. latissima* (2,44 a 16,53 mg de GAE/g de extrato). As algas extraídas com acetona (AcO) apresentaram maior conteúdo em TPC. Porém nas algas *L. ochroleuca* e *A. nodosum* os valores de TPC foram maiores quando se usou o solvente extrator acetato de etilo (AcEt). Por outro lado, as algas extraídas com hexano (Hex) tiveram valores mais baixos de TPC, com exceção das algas *S. latissima*, *B. bifurcata*, *L. ochroleuca* e *S. muticum*, em que os valores mais baixos de TPC foram obtidos quando se usou o solvente etanol (EtOH).

O solvente extrator utilizado nas extrações influencia o processo de extração dos compostos bioativos existente nas macroalgas. Neste caso, o conteúdo fenólico total foi claramente influenciado pelo solvente de extração na seguinte ordem decrescente (Tabela 4.1): AcET>AcO>CHI>Hex>EtOH. Sendo o EtOH solvente polar e solventes apolares CHI, Hex, AcO e AcET.

De acordo com o que se encontra descrito nos artigos científicos, a diminuição da polaridade do solvente resulta num aumento do rendimento dos compostos fenólicos, sendo que em extratos etanólicos, o conteúdo polifenólico é maior do que nos extratos aquosos [59],[81], [84]. Nesse sentido, os resultados deste trabalho são concordantes com os resultados descritos por Farvin and Jacobsen [59]. Efetivamente os solventes apolares apresentaram maior eficácia na extração de compostos fenólicos. Por outro lado, não foi possível comparar os resultados obtidos com os resultados da literatura uma vez que o solvente, a água não foi testada neste trabalho.

Uma das explicações (para além da polaridade) para que os extratos etanólicos de macroalgas castanhas apresentem maior quantidade de compostos fenólicos do que os extratos aquosos, deve-se ao facto do etanol precipitar a maioria das proteínas e deixar alguns compostos fenólicos ligados de forma reversível na solução [59].

Por outro lado, Connan *et al.*, 2004 [81], relataram que a grande variabilidade observada nos conteúdos fenólicos nas algas se deve a fatores ambientais externos como herbivoria, luz profundidade, salinidade, nutrientes e sazonalidade, bem como de fatores intrínsecos, como idade, comprimento e tipo de tecidos. Todos estes fatores podem atuar na regulação espaço temporal das expressões fenólico-metabólicas, induzindo variações qualitativas e quantitativas entre algas.

4.1.2. Determinação TFC (Total flavonoids content)

Na determinação do conteúdo de flavonoides totais, todos os extratos das macroalgas castanhas não apresentaram conter, em quantidades detetáveis, compostos flavonoides na sua composição.

Estes resultados são consistentes com os obtidos por Balboa *et al.*, 2013 [42], López *et al.*, 2011 [80], Onofrejová *et al.*, 2010 [60] e Zubia *et al.*, 2009 [69]. Utilizando a mesma técnica usada neste trabalho, estes autores não detetaram flavonoides nos extratos das macroalgas castanhas. No trabalho descrito por Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2017 [85] também não foi detetada a presença de flavonoides em micro e macroalgas. No entanto, Goiris *et al.*, 2014 [86], revelam a presença de flavonas, isoflavonas e flavonoides em várias linhagens evolutivas de macroalgas como em Rodophyta, Chlorophyta e Ochrophyta. Em concordância, Ruslin *et al.*, 2018 [87], detetaram a presença de flavonoides nas espécies de algas *Sargassum* sp. e *Padina* sp.

4.1.3. Método DPPH-RSA (radical scavenging activity) e FRAP (Ferric reduction activity power)

Nos últimos anos, os antioxidantes naturais têm sido considerados uma alternativa aos antioxidantes sintéticos, normalmente usados para prevenir doenças e oxidação de sistemas alimentares complexos.

A atividade antioxidante dos extratos das macroalgas castanhas foi determinada usando-se o método DPPH-RSA e FRAP. Relativamente ao primeiro método, este consiste na redução do radical DPPH• na presença de um antioxidante doador de hidrogénio. A solução de DPPH•, apresenta uma cor púrpura intensa com absorção máxima a 517 nm. No entanto, na presença de antioxidantes a cor desaparece devido á extinção de radicais livres de DPPH•. Portanto, quanto mais rapidamente a absorvância diminui, mais poder antioxidante a amostra apresenta.

Por outro lado, o ensaio FRAP, mede o potencial de redução do complexo férrico-TPTZ amarelo a um complexo ferroso-TPTZ azul, por um antioxidante sob condições ácidas. É expresso em equivalentes de ácido ascórbico (AAE) e apresenta uma cor azul intensa com máxima absorção a 593 nm.

Avaliando a Tabela 4.1, é possível afirmar que todos os extratos de alga apresentaram atividade antioxidante pelo método DPPH-RSA. Os valores de DPPH variaram de 0,50 (extrato AcO *Bifurcaria bifurcata*) a 145,61 (extrato Hex *Bifurcaria bifurcata*) mg TR/g de extrato. Com base nas medições de DPPH-RSA, os valores mais altos foram obtidos para os extratos da alga *Bifurcaria bifurcata* (0,5 a 145 mg TR/ g extrato) e os valores mais baixos para a macroalga *Pelvetia canaliculata* (2,46 a 16,06 mg TR/g de extrato) e na *Sargassum muticum* (4,01 a 16,19 mg TR/g de extrato).

Avaliando os valores de DPPH-RSA por macroalga castanha, é possível afirmar que quando se usou o solvente de extração EtOH e AcO, obtiveram-se os valores mais baixos de atividade antioxidantes, enquanto as macroalgas extraídas com o solvente AcEt e Hex apresentaram valores mais altos de DPPH-RSA. Contudo, para os extratos da alga *Fucus spiralis*, o etanol foi o solvente mais eficaz na extração de compostos bioativos (60,34 mg TR/g de extrato). Assim sendo, e tal como foi visualizado com o método TPC, o solvente de extração também influencia os valores da capacidade antioxidante determinada pelo método DPPH-RSA:

Nenhuma correlação foi encontrada entre o rendimento da extração, os valores de TPC e DPPH-RSA, o que está de acordo com os resultados reportados por López *et al.*, 2011 [80].

De acordo com López *et al.* , 2011 [80], na avaliação do DPPH-RSA, os extratos de *S. scoparium* tiveram uma maior atividade DPPH-RSA em meio aquoso. Contudo, solventes com maior polaridade obtiveram maior eficiência no rendimento de extração. Para além disso, os extratos com maior conteúdo em composto polifenólicos também levaram a valores mais altos de DPPH-RSA. Acresce que os resultados obtidos por López são concordantes com os resultados obtidos neste trabalho. Outra similaridade foi o facto de ambos os trabalhos, os valores mais baixos de DPPH-RSA terem sido obtido quando se utilizou o EtOH como solvente de extração.

O trabalho realizado por Balboa *et al.*, 2013 [42] foi concordante com os resultados obtidos por López [80] e nesta dissertação.

Kuda *et al.*, 2005 [88], mediram a capacidade antioxidante de quatro algas, *P. kuromo*, *S. lomentaria*, *N. decipiens* e *Porphyra sp.*, sendo que os extratos aquosos das algas em estudo apresentaram capacidade antioxidante mais elevada do que os extratos etanólicos.

Contrariamente, nos trabalhos desenvolvidos por Sabeena Farvin *et al.*, 2013 [59], obteve-se uma correlação entre o rendimento de extração e a atividade de eliminação do radical DPPH. Neste caso, somente os extratos etanólicos das espécies *Fucus*, *P. fucoides* e *S. muticu* apresentaram atividade DPPH-RSA. Estes autores também concluíram que existia uma correlação entre o método TPC e DPPH, sendo que, todos os extratos de água mostraram alta atividade antioxidante, embora as quantidades de fenólicos totais fosse menor que nos etanólicos.

Siriwardhana, Lee, Kim, Ha e Jeon (2003) [89], relataram atividades de eliminação de DPPH mais altas em extratos aquosos e metanólicos de *Hizikia fusiformis* (algas castanhas), do que em extratos em etanol, clorofórmio e acetato de etilo.

Em relação ao método FRAP, analisando a Tabela 4.1, é possível afirmar que todos os extratos de alga apresentaram atividade antioxidante, os valores de FRAP variaram entre 0,87 (*Pelvetia canaliculata* extraída com Hex) a 79,97 mg de AAE/ g de extrato (*Ascophyllus nodosum* extraído com AcET). A maior atividade antioxidante foi observada nos extratos *Fucus spiralis* e *Ascophyllus nodosum* (43 a 79 mg AAE/g de extrato), e no extrato de *Himanthalia elongata* (62 mg AAE/g de extrato). Os solventes orgânicos com menos eficiência na extração, e consequentemente valores mais baixos de FRAP, foram o Hex e o CHI. Enquanto que com os solventes AcO e AcET obtiveram-se os valores mais altos de FRAP.

Sendo assim, é possível denotar que tanto para o TPC e DPPH-RSA, a medição FRAP também for afetada pela natureza dos solventes utilizados na extração dos compostos bioativos. Não foi possível encontrar uma correlação entre os valores de FRAP e o rendimento e os valores de DPPH-RSA, contudo foi observada uma correlação entre os valores de TPC e FRAP ($r=0,9475$), figura 4.1.

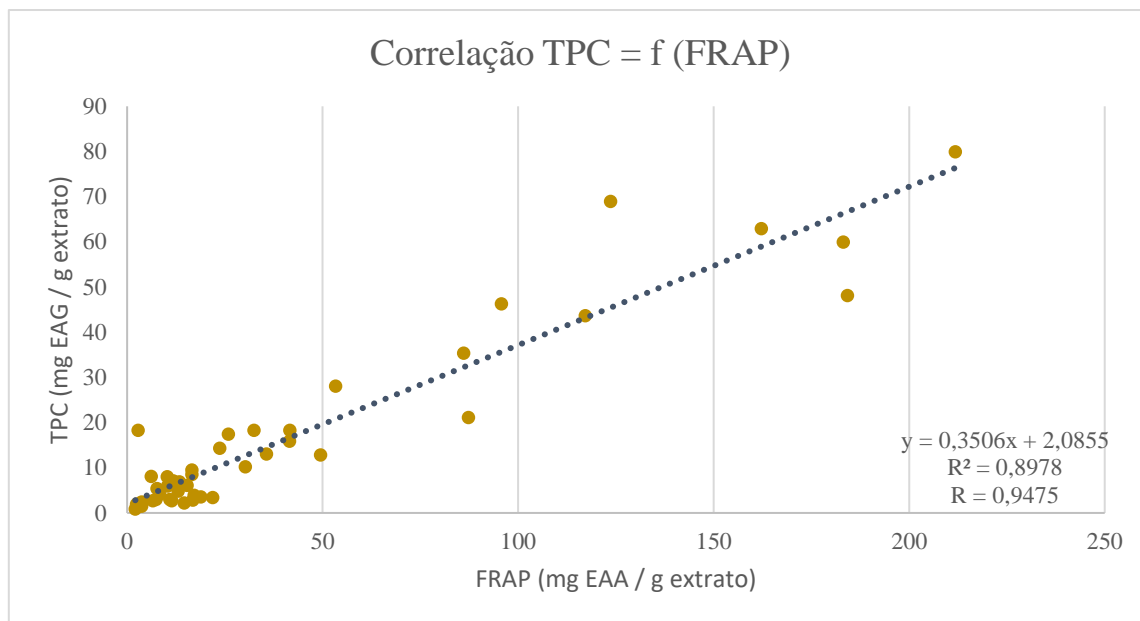


Figura 4.1 - Correlação entre os valores de TPC e FRAP ($r = 0,9475$).

Jiménez-Escrig *et al.*, 2001 [90], relataram que o poder redutor medido pelo ensaio FRAP foi detetado em extratos de *Fucus vesiculosus*, *Laminaria ochroleuca* e *Porphyra umbilicalis*, mas não em extratos de *Undaria pinnatifida* e *Chondrus crispus*, sendo que, neste trabalho, os extratos de *Undaria* apresentaram atividade FRAP.

Kuda *et al.*, 2005 [88], obtiveram maior poder redutor nas macroalgas castanhas, com o método FRAP, quando usaram água como solvente de extração e menor valores de FRAP quando usaram o solvente

Por outro lado, Sabeena Farvin *et al.*, 2013 [59], obtiveram conclusões um pouco diferentes, afirmando que quanto maior o rendimento de extração maior o poder redutor, o que não foi possível observar nos resultados obtidos neste estudo. Contudo, como resultado similar, foi possível observar uma correlação entre o teor fenólico total (TPC), sendo que quanto mais alto o TPC, maior a redução do ferro férrico, o que sugere que os polifenóis das algas podem ser os principais constituintes responsáveis por esta propriedade.

O estudo de Sabeena também confirma o elevado poder redutor das espécies de algas *Fucus*, que relacionam esse elevado poder com a presença de fucoïdan. Os extratos etanólicos também apresentaram menor poder redutor quando comparadas com extratos aquosos, o que indica que compostos hidrofílicos afetam as capacidades redutoras [59]. Para finalizar, nesse trabalho foi efetuado uma análise de componentes principais (PCA), separadamente, para obter uma visão geral das semelhanças e diferenças entre as 16 espécies de algas e investigar a relação entre o TPC, composição fenólica e os diferentes ensaios antioxidantes. A espécie *Fucus*

apresentou uma correlação positiva entre o TPC e capacidade antioxidante. A espécie *M. Stellatus* continha altos valores de ácido hidroxibenzoico, mas apresentou um poder antioxidante mais baixo, indicando que este composto poderá ter tido um efeito negativo nestas propriedades. Concluiu também que um alto teor fenólico se correlaciona com várias atividades antioxidantes, com a exceção da atividade quelante Fe^{2+} , o que indica que os polifenóis das algas são um dos componentes ativos dos extratos estudados. *P. fucooides* e a espécie *Fucus* apresentaram melhor poder redutor, inibição da peroxidação lipídica e elevado conteúdo fenólico total.

Em suma, é possível afirmar que a escolha do solvente extrator influencia a quantidade de compostos bioativos extraídos, sendo a sua escolha um ponto fulcral para otimização do processo e consequentemente uma melhoria nos resultados de TPC e atividade antioxidante. Todos os extratos de macroalgas apresentaram conteúdo fenólico e atividade antioxidante nos dois métodos apresentados. A diferença de resultados entre as macroalgas castanhas deve-se a vários fatores como a espécie, idade, localização geográfica e estação do ano, que afetam diretamente as variações no perfil fitoquímico das algas. Extratos extraídos com solventes com maior polaridade obtiveram maior eficiência. Não foi possível encontrar uma correlação entre o rendimento de extração, TPC e DPPH[•]-RSA contudo, observou-se uma correlação entre o TPC e o método FRAP ($r=0,9475$).

Tabela 4.1 - Rendimento de extração, valores de TPC, DPPH-RSA e FRAP dos extratos em estudo.

Macroalgas	Solventes	Rendimento da extração (%)	TPC (mgGAE/g)	DPR (%)	DPPH (mgtrolox/g)	DPR(%)	FRAP (mgAAE/g)	DPR(%)
<i>Undaria pinnatifida</i>	EtOH	38.8	3.68 ± 0.35	9.56	1.06 ± 0.04	4.09	1.50 ± 0.02	1.12
	ACO	3.40	41.5 ± 3.95	9.53	13.79 ± 0.92	6.68	15.89 ± 1.23	7.76
	AcET	2.40	16.53 ± 1.46	8.84	46.55 ± 0.97	2.09	9.51 ± 0.62	6.55
	Hex	2.20	3.46 ± 0.30	8.73	33.92 ± 2.86	8.43	1.78 ± 0.17	9.37
	CHI	3.20	10.29 ± 1.07	10.41	36.32 ± 1.71	4.71	8.05 ± 0.47	5.82
<i>Himantalia elongata</i>	EtOH	27.0	30.26 ± 2.28	7.54	ND		10.26 ± 1.83	17.83
	ACO	3.60	162.22 ± 5.98	3.69	5.19 ± 0.51	9.88	62.98 ± 2.27	3.60
	AcET	0.20	53.34 ± 4.45	8.35	54.24 ± 3.26	6.01	28.12 ± 2.45	8.70
	Hex	2.10	6.60 ± 0.22	3.28	75.33 ± 8.52	11.31	2.76 ± 0.10	3.72
	CHI	3.20	13.07 ± 0.45	3.47	16.52 ± 2.09	12.66	4.87 ± 0.58	11.92
<i>Pelvetia canaliculata</i>	EtOH	15.6	49.49 ± 3.32	6.71	ND		12.88 ± 0.71	5.54
	ACO	12.2	87.32 ± 2.9	3.32	2.46 ± 0.16	6.69	21.14 ± 0.52	2.45
	AcET	6.90	35.61 ± 3.25	9.13	16.06 ± 0.84	5.21	13.07 ± 0.2	1.52
	Hex	7.60	2.07 ± 0.17	8.31	5.98 ± 0.57	9.62	0.87 ± 0.08	9.76
	CHI	7.70	7.66 ± 0.43	5.67	7.58 ± 0.79	10.41	5.39 ± 0.29	5.43
<i>Saccharina latissima</i>	EtOH	18.0	2.44 ± 0.17	7.11	1.23 ± 0.02	1.84	1.97 ± 0.03	1.42
	ACO	2.90	16.53 ± 0.63	3.82	21.59 ± 1.8	8.32	8.56 ± 0.27	3.12
	AcET	1.40	13.36 ± 0.89	7.21	24.87 ± 2.29	9.2	6.88 ± 0.37	5.37
	Hex	1.70	3.69 ± 0.27	7.43	12.59 ± 0	0	2.48 ± 0.25	10.22
	CHI	0.60	7.36 ± 0.32	4.32	5.97 ± 0.53	8.92	3.02 ± 0.11	3.72
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	EtOH	24.1	11.39 ± 0.32	4.50	73.54 ± 2.95	4.01	2.76 ± 0.15	5.48
	ACO	10.8	86.08 ± 5.54	6.44	0.50 ± 0.03	5.05	35.38 ± 2.16	6.10
	AcET	4.40	21.88 ± 0.94	4.32	110.58 ± 5.09	4.61	3.46 ± 0.28	8.15
	Hex	1.60	18.82 ± 0.85	4.50	145.61 ± 4.6	3.16	3.60 ± 0.31	8.55
	CHI	4.40	16.81 ± 0.77	4.59	107.28 ± 8.95	8.34	2.86 ± 0.17	5.92
<i>Laminaria ochroleuca</i>	EtOH	19.2	2.81 ± 0.25	8.78	5.38 ± 0.18	3.27	18.33 ± 1.27	6.94
	ACO	0.80	14.59 ± 0.75	5.14	22.83 ± 1.59	6.98	2.21 ± 0.14	6.48
	AcET	1.40	32.46 ± 2.54	7.83	72.73 ± 4.01	5.52	18.33 ± 1.27	6.94
	Hex	0.60	3.78 ± 0.24	6.30	56.95 ± 3.09	5.43	2.21 ± 0.14	6.48
	CHI	2.10	11.82 ± 1.01	8.52	6.13 ± 0.13	2.11	7.14 ± 0.56	7.86
<i>Sargassum muticum</i>	EtOH	17.9	8.31 ± 0.33	3.97	4.01 ± 0.23	5.77	4.18 ± 0.10	2.46
	ACO	3.40	25.89 ± 2.54	9.82	5.48 ± 0.21	3.84	17.46 ± 1.09	6.27
	AcET	0.30	41.63 ± 3.97	9.53	16.19 ± 1.08	6.69	18.33 ± 1.51	8.22
	Hex	2.00	10.38 ± 0.41	3.91	6.06 ± 0.62	10.16	5.99 ± 0.29	4.90
	CHI	2.10	15.35 ± 0.97	6.31	4.65 ± 0.39	8.31	6.16 ± 0.65	10.48
<i>Fucus spiralis</i>	EtOH	14.6	95.75 ± 5.28	5.51	60.34 ± 3.07	5.08	46.27 ± 2.28	4.93
	ACO	7.80	184.22 ± 12.82	6.96	57.48 ± 2.08	3.62	48.18 ± 1,00	2.09
	AcET	5.30	123.67 ± 4.50	3.64	52.87 ± 3.14	5.93	68.97 ± 4.54	6.58
	Hex	5.70	10.91 ± 0.49	4.46	56.35 ± 2.43	4.31	3,00 ± 0.07	2.24
	CHI	7.00	17.15 ± 1.24	7.23	53.2 ± 3.86	7.26	3.93 ± 0.27	6.82
<i>Ascophyllus nodosum</i>	EtOH	18.2	117.2 ± 6.33	5.4	52.52 ± 2.27	4.31	43.69 ± 1.03	2.37
	ACO	15.4	183.13 ± 5.3	2.89	73.3 ± 2.26	3.08	59.97 ± 2.03	3.38
	AcET	10.3	211.83 ± 18.22	8.60	89.8 ± 4.28	4.77	79.97 ± 1.11	1.39
	Hex	8.00	6.18 ± 0.36	5.82	3.76 ± 0.18	4.88	8.09 ± 0.007	0.86
	CHI	9.40	23.73 ± 0.80	3.38	29.05 ± 1.26	4.34	14.36 ± 0.92	6.38

4.2. Atividade antimicrobiana

Na avaliação da atividade antimicrobiana foi possível observar as diferenças dos extratos das macroalgas castanhas na resposta à inibição ao crescimento das bactérias *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus* e *S. epidermidis*.

Na Figura 4.1, apresenta-se uma comparação de duas placas utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana promovida por extratos da macroalga *Bifurcaria bifurcata*. Conforme se pode observar na Figura 4.1A os extratos de *Bifurcaria bifurcata* não inibiram o crescimento da bactéria *E. coli* enquanto na Figura 4.1B, os círculos representam a inibição ao crescimento da bactéria *S. epidermidis*. O diâmetro dos círculos de inibição foi medido com um paquímetro digital, tendo sido calculado uma média entre as três repetições feitas na mesma placa e o seu respetivo desvio padrão.

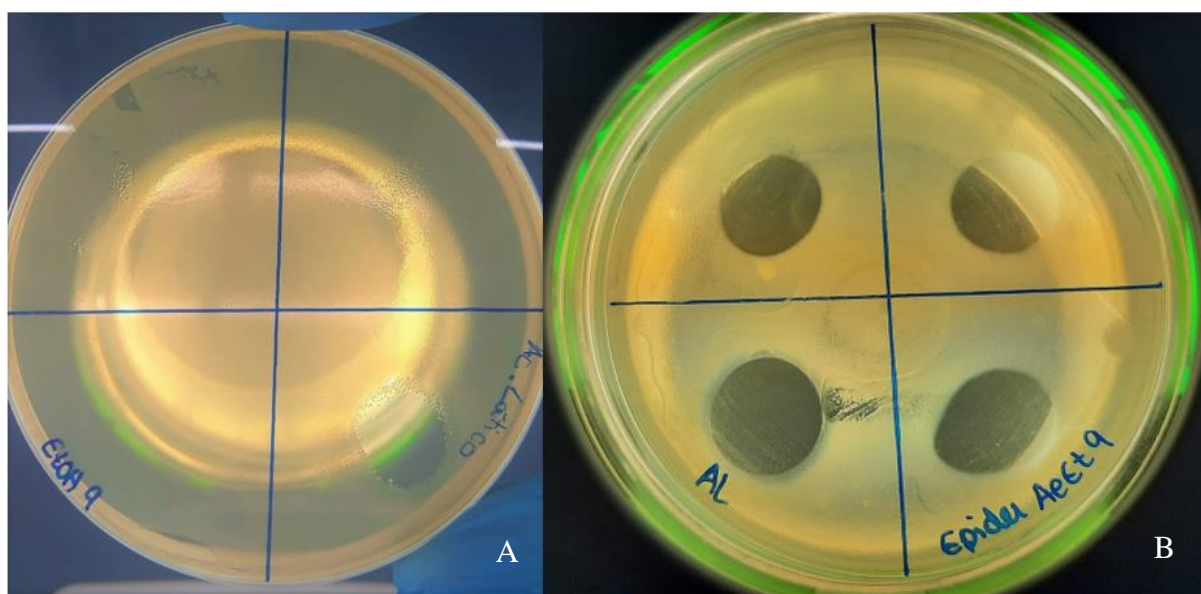


Figura 4.2 - Placas da macroalga, *Bifurcaria bifurcata* (9), com o mesmo solvente, mas diferentes bactérias (**A**: *Escherichia coli* e **B**: *Staphylococcus epidermidis*).

Na Tabela 4.2 apresenta-se a atividade antimicrobiana promovida para todos os extratos das nove macroalgas castanhas que foram extraídas com 5 solventes orgânicos diferentes. Foi possível observar que a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos das macroalgas é influenciada pela natureza do solvente utilizado na extração. Na realidade, para uma mesma macroalga dependendo do solvente extrator, pode ocorrer ou não inibição ao crescimento bacteriano. O controlo positivo, ácido láctico permitiu uma inibição ao crescimento, apresentando diâmetros de inibição de $18,80 \pm 3,18$ mm para Gram-negativa e $17,50 \pm 3,59$ mm

para Gram-positiva. O DMSO, controlo negativo, não teve qualquer atividade inibitória contra nenhuma das bactérias em estudo.

O facto de não existir uma norma para realizar uma avaliação qualitativa e de forma a classificar os diâmetros de zonas de inibição, na presente dissertação adotou-se a classificação dos diâmetros de inibição proposta pela Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, NJ (CLSI). As medições dos diâmetros de inibição têm três categorias, suscetíveis ($S \geq 20$ mm), intermediárias (I, 15-19 mm) e resistentes (R, ≤ 14 mm) [91]. Assim sendo, os resultados obtidos irão ser discutidos com base nesta classificação.

Tendo em conta os resultados apresentados na Tabela 4.2 e no Anexo A, a macroalga *Undaria pinnatifida* não mostrou qualquer inibição ao crescimento das bactérias *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. Para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* apenas houve inibição na macroalga cujos extratos foram obtidos com o solvente AcO e CHI, respetivamente. Na bactéria *B. cereus* só nos extratos com o solvente AcEt é que não houve inibição ao crescimento, tendo todos os outros extratos apresentado inibição ao crescimento desta bactéria. Finalizando com a *S. enteritidis*, esta bactéria foi inibida por todos os extratos desta macroalga. O maior diâmetro de inibição obtido foi de $11,81 \pm 0,30$ mm, contra a *S. enteritidis*, com o solvente AcEt (6,65 mg/mL). Nesta macroalga é possível afirmar que todas as bactérias podem ser consideradas resistentes, pelo facto de os seus diâmetros se encontrarem inferiores a 14 mm.

Abdul-Rehman Phull *et al.*, 2017, avaliaram a atividade antifúngica e antimicrobiana do fucoidan da macroalga *Undaria pinnatifida* e concluíram que teve a maior atividade antibacteriana foi obtida contra a bactéria *S. aureus* (G-positiva) [92]. No entanto, neste estudo os resultados foram contraditórios e apenas o extrato da *Undaria pinnatifida* obtido com CHI revelou um halo pequeno de inibição (9,75 mm) para este microrganismo.

Os resultados na Tabela 4.2 mostram que os ensaios com *S. enteritidis* (Gram-negativa) contra os extratos da *Undaria Pinnatifida* se obteve diâmetros de ausência de crescimento entre 5,21 (hexano) a 11,81 mm (AcEt). Relativamente ao *B. cereus* (Gram-positiva) apesar de se observarem halos com quatro dos cinco extratos avaliados, os diâmetros foram menores, entre 5,19 (Hex) e 5,74 (CHI), logo menor sensibilidade desta bactéria aos extratos. Foi descrito que as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis ao extrato de macroalgas devido à variação da estrutura e composição da parede celular e que as paredes celulares das bactérias Gram-negativas atuam como uma barreira para diferentes antibióticos e condições ambientais [92]. Não foi possível comprovar esta teoria nesta dissertação, porque os extratos da *Undaria*

pinnatifida apresentaram maior atividade antimicrobiana numa bactéria Gram-negativa (*S. enteritidis*) e ausência de atividade numa Gram-positiva (*S. epidermidis*). Assim, seria de esperar que os extratos da *Undaria pinnatifida* tivesse maior atividade antimicrobiana, como refere Abdul-Rehman Phull *et al.*, 2017.

Por outro lado, Patra *et al.*, 2017, determinaram a atividade antimicrobiana com óleo extraído da macroalga *U. pinnatifida* designado de “UPEO” [93]. Os resultados obtidos foram equivalentes aos descritos neste estudo, ou seja, obteve-se maior atividade contra as bactérias Gram-negativas, como exemplo a *Salmonella*, do que na Gram-positiva *S. aureus*.

Pourhajibagher *et al.*, 2019 [94], avaliou a eficiência da atividade antimicrobiana de resinas acrílicas dopadas com diferentes concentrações de *U. pinnatifida* após a ativação com diodo emissor de luz (LED) na produção de danos fotodinâmicos em microbioma multiespécie produtos de biofilme, foi também avaliada a capacidade da ferredoxina, um aceitador de elétrons nas vias metabólicas de *U. pinnatifida*, que pode descarregar elétrons produzidos a partir da clorofila-a fotoexcitada pela irradiação LED. Os resultados mostraram que esta macroalga não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, que neste caso foram *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Lactobacillus acidophilus*.

Os extratos da *Himanthalia elongata* não inibiram o crescimento da bactéria *S. aureus*, e para a *S. epidermidis* só houve inibição com o extrato obtido com solvente EtOH. Dois extratos (AcET e CHI) demonstraram inibir a *E. coli* e outros dois para a *P. aeruginosa* (EtOH e Hex). No que diz respeito ao *B. cereus* apenas não se obteve qualquer halo de inibição com os extratos de Hex e CHI. Enquanto, com a *S. enteritidis* o único extrato que não promoveu inibição foi o extrato obtido com o solvente Hex. Contudo, esta última bactéria, foi a que apresentou um maior diâmetro de inibição (11,67±0,85 mm), com o solvente AcO (6,40 mg/mL). Apesar dos diâmetros obtidos, pode afirmar-se que todas as bactérias podem ser consideradas resistentes a estes extratos, pelo facto de os seus diâmetros se encontrarem abaixo de 14 mm.

De acordo com Martelli *et al.*, 2020, a atividade antimicrobiana de *Himanthalia elongata* é maior contra bactérias Gram-negativas o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho [95]. O mesmo se sucedeu com os trabalhos desenvolvidos por Cox *et al.*, 2014, em que o extrato desta macroalga apresentou uma maior percentagem de inibição contra a *S. abony* (G-negativa) e menor percentagem de inibição contra a *L. monocytogenes* (G-positivo). Contudo ambos os autores justificam estes resultados (contrários ao que estavam descrito:

bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis a agentes antimicrobianos do que as Gram-negativas), devido ao facto de as Gram-negativas possuírem poros que deixam as substâncias hidrofílicas mover-se livremente [84]. Contrariamente, Rajauria *et al.*, 2010, obtiveram atividade antimicrobiana para extratos de *H. elongata* tanto para bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. Contudo, obtiveram maior inibição nas Gram-positivas do que contra as Gram-negativas [96]. Para uma comparação mais exaustiva seria necessário utilizar o mesmo protocolo elaborado por Rajauria, ou seja, efetuar o mesmo processo de extração assim como coletar a alga *H. elongata* na mesma estação do ano.

Relativamente aos extratos da macroalga *Pelvetia canaliculata*, nenhuma bactéria foi inibida de crescer quando em contacto com a maioria dos extratos desta macroalga. Quando se usou a bactéria *S. epidermidis* apenas o extrato com AcO exibiu capacidade inibitória (10,84 mm). Para a *B. cereus* e a *P. aeruginosa* o único extrato que inibiu foi o EtOH (34,05 mg/mL) (7,05 e 13,01 mm, respetivamente). Os extratos obtidos com EtOH, AcO e CHI foram os que permitiram inibição para o crescimento da bactéria *S. enteritidis* (9,14; 10,06 e 4,43 mm, respetivamente). Porém, as bactérias são todas consideradas resistentes, porque o seu diâmetro de inibição foi inferior que 14 mm.

Os únicos dados encontrados na literatura relativamente à macroalga *Pelvetia canaliculata*, está relacionado com a atividade antifúngica sendo que esta macroalga demonstrou uma boa inibição contra *A. flavus* [97].

Os extratos da *Saccharina latissima*, apresentaram inibição contra o crescimento de todas as bactérias. Foi também a macroalga com maior número de extratos (EtOH, AcO e CHI) com capacidade de inibir o crescimento da *E. coli*. Todos os extratos (com os cinco solventes) inibiram a atividade da *P. aeruginosa* (10,55 a 12,00 mm) A bactéria *S. enteritidis* só foi inibida com o extrato obtido com AcO (3,65 mg/mL), sendo que foi o extrato que permitiu um maior diâmetro ($15,38 \pm 0,31$ mm) de inibição. Por outro lado, a *S. epidermidis* só teve inibição pelos extratos efetuados com os solventes AcO e AcEt (13,41 e 6,98 mm, respetivamente). Na *B. cereus* e *S. aureus* só houve um solvente que não conseguiu inibir as bactérias, sendo respetivamente, o CHI e o AcO. As bactérias podem ser consideradas de resistentes a intermediárias, sendo que os seus diâmetros se encontram menores de 14 mm até 16 mm.

Em forma de comparação, Gupta e seus *et al.*, 2013, estudaram a atividade antimicrobiana de algumas algas castanhas, em concreto, da *S. latissima* [98]. Em termos de resultados, estes autores obtiveram uma inibição de crescimento muito elevada contra *L.*

monocytogenes, *S. abony* e *P. aeruginosa*, ou seja, espécies Gram positivas e Gram-negativas, resultados que são concordantes com os obtidos nesta dissertação.

Os extratos da macroalga *Bifurcaria bifurcata*, com a exceção da *E. coli*, mostraram ter uma grande capacidade inibitória perante todas as bactérias. O maior diâmetro de inibição foi exibido com a bactéria *B. cereus* ($23,45 \pm 0,35$ mm), com o extrato obtido com o solvente AcO ($27,95$ mg/mL). Observando a Tabela 4.2 pode-se dizer que maior parte das bactérias, com a exceção da *E. coli*, podem ser consideradas intermediárias e algumas suscetíveis, pelo facto de os seus diâmetros se encontrarem entre 15 mm a ≥ 20 mm.

De acordo com os dados obtidos, esta macroalga mostrou ter uma capacidade inibitória muito favorável quer com Gram-positivas quer com Gram-negativas. Pelo facto de apresentar inibição às bactérias em estudo (exceto *E. coli*) qualquer que seja o solvente orgânico utilizado nas extrações dos compostos bioativos, quer pelos diâmetros de inibição apresentados (maiores nesta macroalga) esta macroalga é que tem maior atividade antimicrobiana. De acordo com a literatura, vários autores [99]–[101], obtiveram o mesmo tipo de resultados, ou seja, esta macroalga também não mostrou inibição à *E. coli*, mas mostrou ter uma alta atividade antimicrobiana contra outras bactérias.

Horta, *et al.*, 2016, utilizou a macroalga *Bifurcaria bifurcata* e testou a capacidade antimicrobiana tendo obtido resultados um pouco diferentes. Os autores demonstram que não existiu atividade antimicrobiana contra *E. coli*, o que está de acordo com os resultados desta dissertação, mas também que não houve inibição na *P. aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Salmonella enteritidis*, mas contra as bactérias *B. subtilis* e *S. aureus* sofreram inibição [100]. Outro estudo, mostrou que o maior diâmetro obtido foi contra *P. aeruginosa*, mas também houve atividade contra a *E. coli* e a *S. aureus*. Contudo o solvente utilizado na extração foi o metanol o que evidencia que diferentes solventes devolvem obter respostas distintas, o que também foi comprovado nesta dissertação [99].

Os extratos da macroalga *Laminaria ochroleuca*, mostraram capacidade de inibir a bactéria *P. aeruginosa* (qualquer que seja o solvente; 4,53 a 11,55 mm). Para as bactérias *B. cereus* e *S. aureus*, só não houve inibição do crescimento destas bactérias com o extrato obtido com Hex. A bactéria *S. enteritidis* foram inibidas de crescer com os extratos de *Laminaria ochroleuca* obtidos com EtOH e CHI. Por fim, a *E. coli* e a *S. epidermidis*, só foram inibidas quando se utilizou o solvente CHI e AcO, respetivamente. A *E. coli* exibiu o maior diâmetro de inibição ($12,76 \pm 4,38$ mm) quando a extração ocorreu com o solvente CHI ($4,05$ mg/mL). Os

diâmetros obtidos foram abaixo de 14 mm o que se pode considerar que as bactérias são resistentes.

De acordo com Boujaber *et al.*, 2016, a atividade antimicrobiana da *Laminaria ochroleuca* foi maior com extratos obtidos com diclorometano ou metanol [102]. Por outro lado, é de notar que os extratos desta macroalga inibiram a *P. aeruginosa*, *S. faecalis* (Gram-positiva), *S. aureus* e *E. coli*, o que em contraste com a presente dissertação que não apresentou inibição contra *E. coli* mas apresentou para *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Os extratos obtidos da *Sargassum muticum* (com todos os solventes), foram capazes de inibir, duas bactérias, a *P. aeruginosa* e *B. cereus*. Sendo que o maior diâmetro de inibição foi contra a *P. aeruginosa* ($11,89 \pm 3,04$ mm), com a utilização do solvente de extração AcEt (3,15 mg/mL) (Figura 4.3). Não houve qualquer inibição quando se utilizou a bactéria *E. coli*. Na *S. epidermidis* houve inibição apenas com os extratos obtidos com EtOH e AcEt, para a bactéria *S. enteritidis* só houve inibição para o extrato de CHI e por fim para a *S. aureus* houve inibição para os extratos com EtOH, AcEt e CHI. Para os extratos desta macroalga é possível afirmar que todas as bactérias podem ser consideradas resistentes, pelo facto de os seus diâmetros se encontrarem inferiores a 14 mm.



Figura 4.3 - Atividade antimicrobiana da macroalga *Sargassum muticum*. (A: menor diâmetro de inibição (crescimento retardado) e B: maior diâmetro de inibição).

Vinayaga Moothi *et al.*, 2015, concluíram que os extratos obtidos com os solventes, acetona e clorofórmio exibiram maior atividade antibacteriana contra bactérias patogénicas humanas em comparação ao extrato obtido em metanol. Extratos obtidos de solventes, como acetona e clorofórmio, inibiram as bactérias, como *Micrococcus sp.*, *S. paratyphi B*, *Salmonella typhi*, *S. aureus* e *S. fleischneri*, com diâmetros de 11 mm [103]. Foi também observado que os

extratos solventes testados foram altamente eficientes contra bactérias Gram-negativas em comparação com bactérias Gram-positivas. Estes resultados são distintos dos obtidos nesta atividade experimental, uma vez que o extrato que deu origem a um e maior diâmetro foi o obtido com AcEt e apresentou maior resposta para Gram positivas do que negativas. Contudo, Mishra, contradiz com o seu estudo em que analisou o potencial bioativo de quatro espécies de algas inclusive *Sargassum wightii* que mostrou ser uma macroalga mais eficaz contra bactérias Gram-positivas, como exemplo *S. aureus*, e bactérias Gram-negativas, como *E.coli* e *P. aeruginosa*. Sugerindo assim que esta macroalga tem um grande potencial antibacteriano, dependendo da sua composição bioquímica [104].

Os extratos da *Fucus spiralis*, não mostraram ter grande capacidade inibitória. O extrato obtido com AcO foi o único capaz de inibir a bactéria *B. cereus*, *S. aureus* e *S enteritidis*. Sendo que o maior diâmetro inibitório obtido, foi com a *S. enteritidis* (13,49±3,12 mm), com o extrato de AcO (19,30 mg/mL). O extrato de CHI foi o único que inibiu a *E. coli*. Para a bactéria *S. epidermidis*, esta foi inibida com os extratos de AcEt e de Hex. Para os extratos desta macroalga é possível afirmar que todas as bactérias podem ser consideradas resistentes, pelo facto de os seus diâmetros se encontrarem inferiores a 14 mm.

De acordo com Freitas, *et al.*, 2020, que avaliou a capacidade antimicrobiana de *Fucus spiralis* contra duas bactérias Gram-positivas, uma delas a *S. epidermidis* e obteve como resultados a inibição do crescimento destas bactérias [105]. Estes resultados são concordantes com os apresentados nesta tese, visto que, os extratos desta macroalga apresentaram mais inibição contra bactérias Gram-positivas, sendo que a *S. epidermidis* conseguiu ser inibida com extratos obtidos com dois solventes diferentes.

Para finalizar, não houve nenhuma bactéria que fosse totalmente inibida pelos extratos da *Ascophyllus nodosum*. No entanto, a *E. coli* apenas foi inibida com o extrato obtido com EtOH (13,63 mm), acontecendo o mesmo com a bactéria *S. aureus* (17,70 mm). Dois extratos obtidos por solventes diferentes inibiram a *B. cereus* (AcO e Hex) e a *S enteritidis* (EtOH e CHI). A *P. aeruginosa* foi inibida pelo extrato com AcO (15,28 mm) e para finalizar a bactéria *S. epidermidis* foi inibida pelos extratos obtidos com EtOH, AcO e AcEt. O maior diâmetro de inibição foi obtido com *B. cereus* (18,24±4,26mm), tendo a extração ocorrido com o solvente AcO (32,35 mg/mL) (Figura 4.4). De acordo com o padrão admitido para classificar qualitativamente, o extrato desta macroalga apresenta boa inibição, sendo que as bactérias

podem ser consideradas de intermediárias a suscetíveis, pelo facto de os seus diâmetros estarem maioritariamente entre 14 a 20 mm.

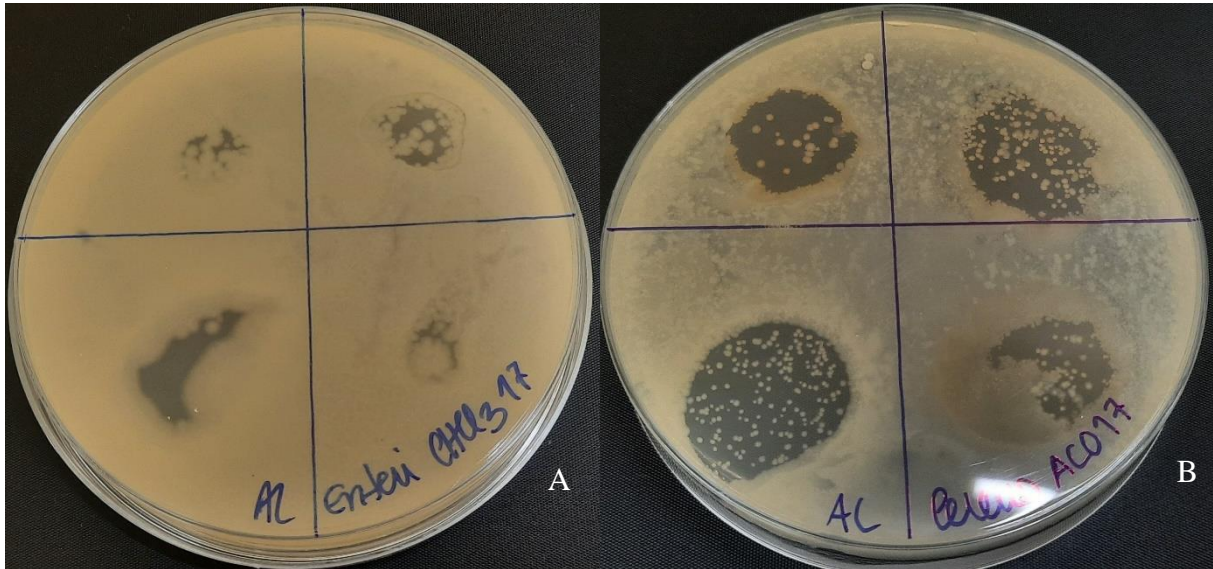


Figura 4.4 - Atividade antimicrobiana dos extratos da macroalga *Ascophyllus nodosum*. (A: menor diâmetro de inibição (crescimento retardado) e B: maior diâmetro de inibição).

De acordo com Jiménez, *et al.*, 2010, esta macroalga apresentou uma forte atividade antibacteriana que foi notavelmente maior do que dos controlos positivos. O extrato de acetona foi o mais eficaz contra bactérias Gram-positivas [106]. Esta macroalga também obteve ótimos resultados na literatura contra a bactéria *E. coli*, o que foi possível visualizar nos resultados apresentados na Tabela 4.2, que houve inibição para o solvente EtOH mas que foi uma boa inibição, sendo esta bactéria, pela avaliação qualitativa escolhida, intermediária [107].

Na figura 4.5 está representado graficamente a média dos diâmetros obtidos, em que o maior diâmetro corresponde a uma maior capacidade antimicrobiana. Dito isto, é possível verificar que a macroalga *Bifurcaria bifurcata* é a que apresenta uma atividade antimicrobiana superior, não descartando a alga *Ascophyllus nodosum* que têm uma capacidade de inibir fortemente as bactérias, pelo facto dos seus diâmetros terem um valor elevado, mesmo não apresentando resposta inibitória a todos as bactérias.

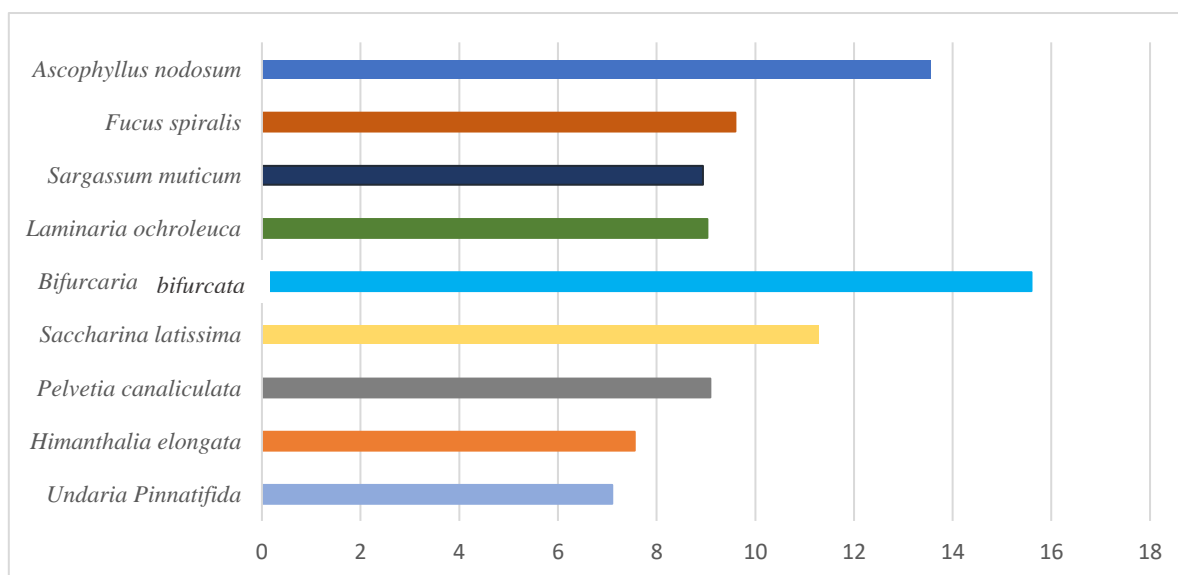


Figura 4.5 - Diâmetro médio das macroalgas castanhas em estudo.

Depois desta breve análise é possível concluir que a bactéria *E. coli* apresenta resistência a quase todas as algas em estudo e a *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *B.cereus* as mais afetadas pelas macroalgas em estudo (figura 4.6). Por outro lado, os extratos da macroalga *Bifurcaria bifurcata* apresentam uma boa resposta inibitória a todas as bactérias, à exceção da *E. coli*. A espécie das bactérias, não é um fator chave na resposta antimicrobiana, porque a resposta não foi idêntica entre espécies perante as diferentes macroalgas. Contudo, podemos afirmar que os maiores diâmetros de inibição, entre os extratos, foram para as bactérias da espécie Gram-negativas. Sendo que, de acordo com a literatura supra referida, a produção de compostos antimicrobianos por organismos marinhos contra bactérias Gram-positivas parecem ser mais frequentes. A atividade geralmente baixa dos extratos contra organismos Gram-negativos pode ser devido ao facto de que as bactérias G (-) possuem uma membrana externa e um espaço periplasmático, que estão ausentes nas bactérias G- (+). A membrana externa das Gram-negativas é conhecida por apresentar uma barreira à penetração de numerosas moléculas de antibióticos. Além disso, o espaço periplasmático contém enzimas que são capazes de degradar moléculas estranhas que vêm do exterior [108]. Em geral, as diferenças da atividade demonstrada pelas algas testadas parecem estar diretamente relacionadas com a diversidade qualitativa e/ou quantitativa dos compostos presentes nos extratos. Supõem-se que as plantas ricas em metabolitos secundários diversos, pertençam a classes químicas como taninos e terpenos. Isto sugere que a força das atividades biológicas de um produto natural depende da diversidade e quantidade desses constituintes.

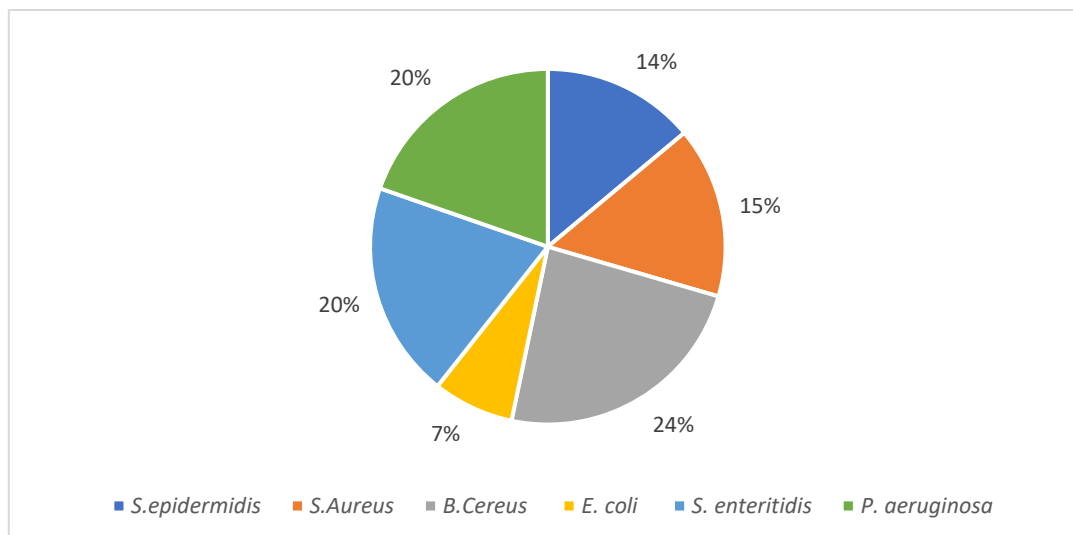


Figura 4.6 - Suscetibilidade das bactérias em estudo, sendo a *E. coli* a mais resistente e a *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *B. cereus* as mais afetadas pelas macroalgas em estudo.

Em relação à seleção de solventes, não existe uma correlação clara entre a polaridade do solvente e os resultados antimicrobianos, como pode ser observado na Tabela 4.2 e figura 4.7. No entanto, os dados obtidos sugerem que os solventes polares foram mais eficientes nos extratos de compostos antimicrobianos das macroalgas. Os extratos de AcO e EtOH levam a quase 50% das respostas de inibição positivas. Porém, também é de suma importância considerar a toxicidade dos solventes empregados, embora a acetona seja um dos solventes menos tóxicos podendo causar narcose temporária e irritação ocular [109], por outro lado, o etanol é reconhecido como de grande importância para da indústria de alimentos até mesmo à cultura abstêmia [110]. Além disso, o etanol foi o solvente que apresentou maior rendimento de extração, portanto, o etanol deve ser considerado como solvente preferencial. As observações gerais reforçadas por estudos anteriores, indicando que a capacidade antimicrobiana dos extratos de algas é dependente do solvente [36]. Conseqüentemente, este parâmetro deve ser otimizado para cada caso.

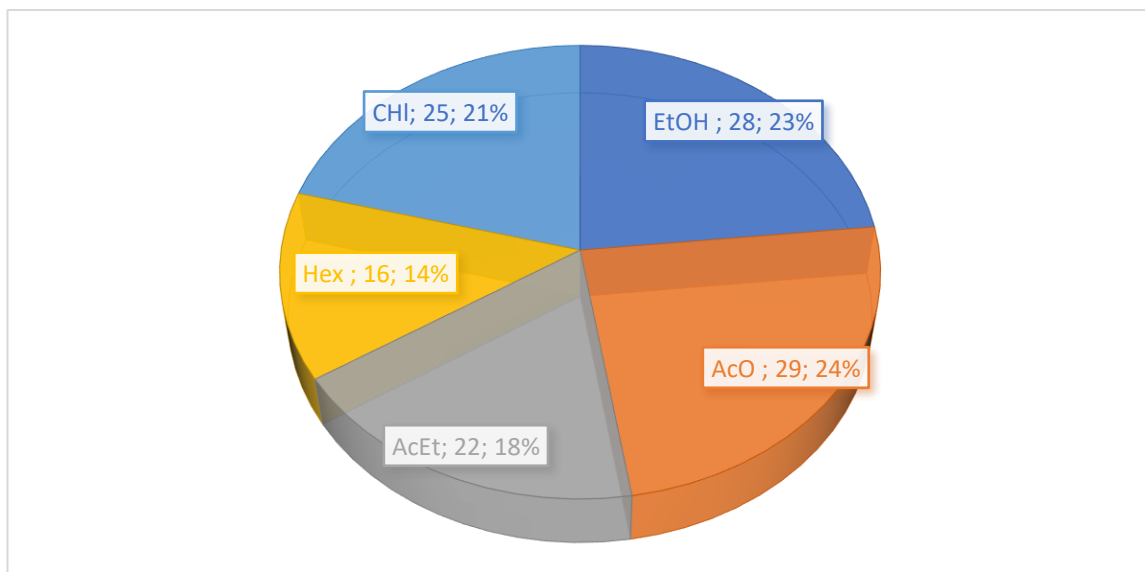


Figura 4.7 - Representação gráfica do número total de respostas dos solventes para os extratos em estudo; percentagem da contribuição de cada solvente na capacidade antimicrobiana.

No anexo A estão representadas tabelas pormenorizadas em relação às leituras das placas de Petri na avaliação da atividade antimicrobiana.

Tabela 4.2 - Inibição das macroalgas em estudo e respectivas concentrações.

			Inibição (mm)					
			Gram-positivas			Gram- negativas		
Macroalga	Solvente	C (mg/mL)	<i>S. epidermidis</i> (G- (+))	<i>B. cereus</i> (G- (+))	<i>S. aureus</i> (G- (+))	<i>E. coli</i> (G- (-))	<i>S. enteritidis</i> (G- (-))	<i>P. aeruginosa</i> (G- (-))
<i>Undaria Pinnatifida</i>	EtOH	45,25	NI	5,49±2,19	NI	NI	7,34±0,47	NI
	AcO	6,45	NI	5,74±1,68	NI	5,86 ±1,08	9,51±1,47	NI
	AcEt	6,65	NI	NI	NI	NI	11,81±0,30	NI
	Hex	7,90	NI	5,19±2,75	NI	NI	5,21±0,20	NI
	CHI	4,25	NI	5,74±1,30	9,75±0,44	NI	9,11±0,60	NI
<i>Himanthalia elongata</i>	EtOH	38,20	8,94±0,67	6,20±1,68	NI	NI	5,65±2,50	6,42±0,49
	AcO	6,40	NI	6,36±0,71	NI	NI	11,67±0,85	NI
	AcEt	5,30	NI	6,71±0,71	NI	6,28±0,42	10,42±1,14	NI
	Hex	4,45	NI	NI	NI	NI	NI	7,06±0,58
	CHI	7,25	NI	NI	NI	7,52±0,22	7,44±0,46	NI
<i>Pelvetia canaliculata</i>	EtOH	34,05	NI	7,05±0,88	NI	NI	9,14±0,42	13,01±2,90
	AcO	23,40	10,84 ±1,70	NI	NI	NI	10,06±1,65	NI
	AcEt	17,75	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	Hex	15,65	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	CHI	17,65	NI	NI	NI	NI	4,43±0,67	NI
<i>Saccharina latissima</i>	EtOH	34,85	NI	11,83±0,22	13,96±2,98	14,08±0,43	NI	11,83±1,52
	AcO	3,65	13,41±0,69	7,56±1,06	NI	14,12±4,92	15,38±0,31	12,00±0,45
	AcEt	3,15	6,98±2,88	8,28±1,01	10,98±2,88	NI	NI	11,98±5,14
	Hex	4,05	NI	7,52±0,28	9,78±1,83	NI	NI	10,99±1,06
	CHI	3,45	NI	NI	11,13±1,86	12,65±0,94	NI	10,55±3,18
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	EtOH	23,00	13,05±1,28	15,35±2,13	16,74±4,79	NI	18,14±1,60	10,43±0,08
	AcO	27,95	18,39±5,03	23,45±0,35	12,81±1,56	NI	20,84±0,63	20,29±1,13
	AcEt	12,00	16,55±0,95	15,37±1,79	14,12±3,22	NI	16,88±1,71	11,53±0,55
	Hex	8,20	18,22±1,36	11,90±3,39	10,60±2,05	NI	17,28±0,43	10,03±1,13
	CHI	11,05	16,44±4,63	13,68±1,74	11,73±3,29	NI	12,14±2,07	11,74±1,49

Tabela 4.2 - Inibição das macroalgas em estudo e respectivas concentrações.

			Inibição (mm)					
			Gram-positivas			Gram-negativas		
Macroalga	Solvente	C (mg/mL)	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Laminaria ochroleuca</i>	EtOH	31,75	NI	109,57±1,81	9,94±0,64	NI	8,93±1,07	9,12±0,90
	AcO	3,20	8,20±1,95	5,95±0,54	10,27±0,99	NI	NI	11,49±1,82
	AcEt	2,80	NI	7,48±0,85	10,24±0,47	NI	NI	11,55±0,81
	Hex	1,65	NI	NI	NI	NI	NI	4,53±0,55
	CHI	4,05	NI	8,61±0,56	10,64±2,65	12,76±4,38	10,75±1,05	8,43±1,58
<i>Sargassum muticum</i>	EtOH	35,85	9,73±1,48	6,89±2,44	6,36±0,41	NI	NI	9,06±0,64
	AcO	8,10	NI	10,42±1,50	NI	NI	NI	7,89±2,94
	AcEt	3,15	9,22±0,77	8,53±0,89	8,90±1,50	NI	NI	11,89±3,04
	Hex	3,70	NI	5,35±1,22	NI	NI	NI	8,94±0,97
	CHI	3,75	NI	9,19±0,78	5,76±0,91	NI	9,71±3,38	9,39±1,95
<i>Fucus spiralis</i>	EtOH	32,90	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	AcO	19,30	NI	7,28±4,60	10,38±1,81	NI	13,49±3,12	NI
	AcEt	12,20	12,57±0,86	NI	NI	NI	NI	NI
	Hex	11,30	6,04±2,52	NI	NI	NI	NI	NI
	CHI	11,35	NI	NI	NI	8,60±0,29	NI	NI
<i>Ascophyllus nodosum</i>	EtOH	42,50	14,97±3,92	NI	13,63±0,85	17,70±3,58	9,71±1,72	NI
	AcO	32,35	13,07±2,01	18,24±4,26	NI	NI	NI	15,28±1,91
	AcEt	19,85	13,85±4,21	NI	NI	NI	NI	NI
	Hex	13,70	NI	10,79±0,84	NI	NI	NI	NI
	CHI	12,45	NI	NI	NI	NI	8,30±1,61	NI

NI – Não Inibiu

5. Conclusão

Esta dissertação teve como objetivo principal avaliar o efeito de cinco diferentes solventes extratores orgânicos (EtOH, AcO, AcEt, CHI e Hex) no rendimento de extração, conteúdo polifenólico, capacidade antioxidante e capacidade antimicrobiana de nove espécies de algas castanhas, *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata*, *Bifurcaria bifurcata*, *Sargassum muticum*, *Laminaria ochroleuca*, *Saccharina latíssima*, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus spiralis* e *Ascophyllum nodosum*.

O interesse por este recurso marinho deve-se principalmente ao facto das macroalgas castanhas representarem uma fonte promissora de compostos bioativos naturais para serem utilizados, por exemplo, como alimentos funcionais pelas indústrias, no entanto, o teor de compostos bioativos nos extratos de algas é determinado pela metodologia da extração aplicada, sendo que a escolha do solvente pode ser crítica, pelo facto da extração depender do solvente extrator. Sem desvalorizar a necessidade de considerar a sua natureza, a sua segurança e também a proteção ambiental.

A escolha do solvente de extração, influenciou todas as propriedades das algas, sendo a sua escolha um ponto crucial para otimização do processo e conseqüentemente uma melhoria dos resultados obtidos. O maior rendimento de extração foi alcançado quando o etanol foi usado como solvente de extração. Todos os extratos de macroalgas apresentaram conteúdo fenólico e atividade antioxidante nos dois métodos apresentados (FRAP e DPPH[•] – RSA). Em relação aos valores de TPC, DPPH[•] – RSA e FRAP, o acetato de etilo foi o solvente que possibilitou as maiores capacidades antioxidantes. No que diz respeito à composição das espécies de macroalgas castanhas, os maiores valores de TPC e FRAP foram encontrados na espécie *Ascophyllum nodosum*, enquanto os maiores valores de DPPH[•]- RSA foram alcançados em *Fucus spiralis*. A diferença de resultados entre as macroalgas castanhas deve-se a vários fatores como a espécie, idade, localização geográfica e estação do ano, que afetam diretamente as variações no perfil fitoquímico das algas. Extratos extraídos com solventes com maior polaridade obtiveram maior eficiência. Não foi possível encontrar uma correlação entre o rendimento de extração, TPC e DPPH[•]-RSA contudo, observou-se uma correlação entre o TPC e o método FRAP ($r=0,9475$).

Na avaliação da capacidade antimicrobiana os extratos de algas também foram dependentes do solvente extrator escolhido. Contudo, foi possível retirar algumas conclusões, relativamente as bactérias estudadas, a *E. coli* teve uma resposta resistente à maior parte das macroalgas

castanhas. É possível as espécies das bactérias sejam um fator chave na resposta antimicrobiana já que a resposta não foi idêntica entre espécies perante as diferentes algas, todavia os maiores diâmetros de inibição aconteceram para as bactérias Gram-negativas. Por outro lado, relativamente as macroalgas testadas *Saccharina latíssima*, *Bifurcaria bifurcata* e *Ascophyllus nodosum* foram as algas mais promissoras considerando o seu potencial como agentes antimicrobianos. Em geral, as diferenças da atividade antimicrobiana, demonstrada pelas algas testadas, parecem estar diretamente relacionadas com a diversidade qualitativa e/ou quantitativa dos compostos presentes nos extratos.

Bibliografia

- [1] D. A. Della Sala, *Oceans and global change: One blue planet*, vol. 1–5, no. 3. Elsevier Inc., 2017.
- [2] S. K. Kim, *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*. 2011.
- [3] L. Pereira and F. Correia, *Algas Marinhas da Costa Portuguesa—Ecologia, Biodiversidade e Utilizações*, 1st ed. Paris, France, 2015.
- [4] L. Pereira, “Macroalgae,” *Encyclopedia*, vol. 1, no. 1, pp. 177–188, Feb. 2021, doi: 10.3390/encyclopedia1010017.
- [5] L. Pereira, “Guia ilustrado das macroalgas: conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa,” *Guia Ilus. das macroalgas conhecer e reconhecer algumas espécies da flora Port.*, no. April 2009, 2009, doi: 10.14195/978-989-26-0397-1.
- [6] A. Silva *et al.*, “Antibacterial use of macroalgae compounds against foodborne pathogens,” *Antibiotics*, vol. 9, no. 10, pp. 1–41, 2020, doi: 10.3390/antibiotics9100712.
- [7] A. Silva *et al.*, “Macroalgae as a source of valuable antimicrobial compounds: Extraction and applications,” *Antibiotics*, vol. 9, no. 10, pp. 1–41, 2020, doi: 10.3390/antibiotics9100642.
- [8] A. Pal, M. C. Kamthania, and A. Kumar, “Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds — A Review,” pp. 1–17, 2014, doi: 10.4236/oalib.1100752.
- [9] H. Domínguez, *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. Woodhead Publishing, 2013.
- [10] M. D. Guiry and G. M. Guiry, “Algaebase,” *World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway*. <https://www.algaebase.org> (accessed Mar. 10, 2021).
- [11] G. F. El-Said and A. El-Sikaily, “Chemical composition of some seaweed from Mediterranean Sea coast, Egypt,” *Environ. Monit. Assess.*, vol. 185, no. 7, pp. 6089–6099, 2013, doi: 10.1007/s10661-012-3009-y.
- [12] L. Pereira, “As Algas Marinhas e Respektivas Utilidades As Algas Marinhas e Respektivas Utilidades Leonel Pereira,” no. April 2010, 2010.
- [13] K. H. M. Cardozo *et al.*, “Metabolites from algae with economical impact,” *Comp.*

-
- Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 146, no. 1-2 SPEC. ISS., pp. 60–78, 2007, doi: 10.1016/j.cbpc.2006.05.007.
- [14] M. Plaza, A. Cifuentes, and E. Ibáñez, “In the search of new functional food ingredients from algae,” *Trends Food Sci Technol.*, pp. 1–26, 2008.
- [15] I. Wijesekara, S. K. Kim, Y. Li, and Y. X. Li, “Phlorotannins as bioactive agents from brown algae,” *Process Biochem.*, vol. 46, no. 12, pp. 2219–2224, 2011, doi: 10.1016/j.procbio.2011.09.015.
- [16] J. L. Harwood and I. A. Guschina, “The versatility of algae and their lipid metabolism,” *Biochimie*, vol. 91, no. 6, pp. 679–684, 2009, doi: 10.1016/j.biochi.2008.11.004.
- [17] I. A. Guschina and J. L. Harwood, “Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 160–186, 2006, doi: 10.1016/j.plipres.2006.01.001.
- [18] L. Pereira, “MACOI - Portuguese Seaweeds Website,” *World-wide electronic publication. IMAR, Departmente of Life Sciences, University of Coimbra.* <http://macoi.ci.uc.pt/default.php> (accessed Mar. 14, 2021).
- [19] L. Cao, S. G. Lee, K. T. Lim, and H. R. Kim, “Potential Anti-Aging Substances Derived from Seaweeds,” *Mar. Drugs*, vol. 18, no. 11, pp. 1–22, 2020, doi: 10.3390/md18110564.
- [20] E. Yang, Y. M. Ham, W. J. Lee, N. H. Lee, and C. Hyun, “Anti-inflammatory effects of apo-9'-fucoxanthinone from the brown alga, *Sargassum muticum*,” no. May 2015, 2013, doi: 10.1186/2008-2231-21-62.
- [21] L. Pereira, *A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds - Chapter 2.* 2011.
- [22] “GBIF - Global Biodiversity Information Facility,” 2021. <https://www.gbif.org/> (accessed Mar. 12, 2021).
- [23] S. Fredericq and W. E. Schmidt, “Red Algae,” in *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, 2016, pp. 1–7.
- [24] D. A. Vатtem and V. Maitin, “Functional Foods, Nutraceuticals and Natural Products: Concepts and Applications,” p. 836, 2015, [Online]. Available: <https://books.google.com/books?id=T3LDCgAAQBAJ&pgis=1>.
-

-
- [25] P. V. Subba-Rao, V. A. Mantri, and K. Ganesan, "Mineral composition of edible seaweed *Porphyra vietnamensis*," *Food Chem.*, vol. 102, no. 1, pp. 215–218, 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.05.009.
- [26] C. Taboada, R. Millán, and I. Míguez, "Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 90, no. 3, pp. 445–449, Feb. 2010, doi: 10.1002/jsfa.3836.
- [27] T. A. Davis, B. Volesky, and A. Mucci, "A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae," *Water Research*, vol. 37, no. 18. Elsevier Ltd, pp. 4311–4330, Nov. 01, 2003, doi: 10.1016/S0043-1354(03)00293-8.
- [28] C. Dawczynski, U. Schäfer, M. Leiterer, and G. Jahreis, "Nutritional and toxicological importance of macro, trace, and ultra-trace elements in algae food products," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 25, pp. 10470–10475, Dec. 2007, doi: 10.1021/jf0721500.
- [29] V. Romarís-Hortas, C. García-Sartal, M. C. Barciela-Alonso, A. Moreda-Piñeiro, and P. Bermejo-Barrera, "Characterization of edible seaweed harvested on the galician coast (northwestern Spain) using pattern recognition techniques and major and trace element data," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 3, pp. 1986–1992, Feb. 2010, doi: 10.1021/jf903677y.
- [30] K. Miyashita, N. Mikami, and M. Hosokawa, "Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review," *J. Funct. Foods*, vol. 5, no. 4, pp. 1507–1517, 2013, doi: 10.1016/j.jff.2013.09.019.
- [31] Z. El Rashed, E. Grasselli, H. Khalifeh, L. Canesi, and I. Demori, "Brown-Algae Polysaccharides as Active Constituents against Nonalcoholic Fatty Liver Disease," *Planta Med.*, no. November, 2020, doi: 10.1055/a-1273-3159.
- [32] S. Wang, Y. Li, W. White, and J. Lu, "Extracts from New Zealand *Undaria pinnatifida* Containing Fucoxanthin as Potential Functional Biomaterials against Cancer in Vitro," *J. Funct. Biomater.*, vol. 5, no. 2, pp. 29–42, 2014, doi: 10.3390/jfb5020029.
- [33] S. L. Holdt and S. Kraan, "Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation," *J. Appl. Phycol.*, vol. 23, no. 3, pp. 543–597, 2011, doi: 10.1007/s10811-010-9632-5.
- [34] A. K. F. S. de Sousa *et al.*, "Antinociceptive activity of *Sargassum polyceratum* and the

-
- isolation of its chemical components,” *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 25, no. 6, pp. 683–689, 2015, doi: 10.1016/j.bjp.2015.07.017.
- [35] M. Barbosa, “Phaeophyceae): Phlorotannins in the Pursuit of Natural Alternatives to Tackle Neurodegeneration,” pp. 1–20, 2020.
- [36] M. J. Pérez, E. Falqué, and H. Domínguez, “Antimicrobial action of compounds from marine seaweed,” *Mar. Drugs*, vol. 14, no. 3, 2016, doi: 10.3390/md14030052.
- [37] N. Vinay and S. Kim, “Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 32, no. 3, pp. 325–335, 2011, doi: 10.1016/j.etap.2011.09.004.
- [38] R. Dewick, P.M Perroy and S. Careas, *Medicinal Natural Products Medicinal*, vol. 1. 2015.
- [39] C. D. Amsler and V. A. Fairhead, “Defensive and Sensory Chemical Ecology of Brown Algae,” *Adv. Bot. Res.*, vol. 43, no. C, pp. 1–91, 2005, doi: 10.1016/S0065-2296(05)43001-3.
- [40] L. E. Rioux, L. Beaulieu, and S. L. Turgeon, “Seaweeds: A traditional ingredients for new gastronomic sensation,” *Food Hydrocoll.*, vol. 68, pp. 255–265, 2017, doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.02.005.
- [41] A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, M. A. Lage-Yusty, and J. López-Hernández, “Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption,” *Food Chem.*, vol. 121, no. 2, pp. 634–638, 2010, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.12.078.
- [42] E. M. Balboa, E. Conde, A. Moure, E. Falqué, and H. Domínguez, “In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae,” *Food Chem.*, vol. 138, no. 2–3, pp. 1764–1785, 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.026.
- [43] S. Y. Xu, X. Huang, and K. L. Cheong, “Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities,” *Mar. Drugs*, vol. 15, no. 12, pp. 1–16, 2017, doi: 10.3390/md15120388.
- [44] M. L. Wells *et al.*, “Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 29, no. 2, pp. 949–982, 2017, doi: 10.1007/s10811-016-0974-5.
-

-
- [45] S. Ermakova *et al.*, “Water-soluble polysaccharides from the brown alga *Eisenia bicyclis*: Structural characteristics and antitumor activity,” *Algal Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 51–58, 2013, doi: 10.1016/j.algal.2012.10.002.
- [46] M. F. De Jesus Raposo, A. M. B. De Moraes, and R. M. S. C. De Moraes, “Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications,” *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 5, pp. 2967–3028, 2015, doi: 10.3390/md13052967.
- [47] M. A. Praveen, K. R. K. Parvathy, P. Balasubramanian, and R. Jayabalan, “An overview of extraction and purification techniques of seaweed dietary fibers for immunomodulation on gut microbiota,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 92, no. June, pp. 46–64, 2019, doi: 10.1016/j.tifs.2019.08.011.
- [48] E. F. Vieira *et al.*, “Seaweeds from the Portuguese coast as a source of proteinaceous material: Total and free amino acid composition profile,” *Food Chem.*, vol. 269, no. June, pp. 264–275, 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.145.
- [49] U. G. Bak, C. W. Nielsen, G. S. Marinho, Ó. Gregersen, R. Jónsdóttir, and S. L. Holdt, “The seasonal variation in nitrogen, amino acid, protein and nitrogen-to-protein conversion factors of commercially cultivated Faroese *Saccharina latissima*,” *Algal Res.*, vol. 42, no. June, p. 101576, 2019, doi: 10.1016/j.algal.2019.101576.
- [50] M. K. Dhar, A. Koul, and S. Kaul, “Farnesyl pyrophosphate synthase : a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development,” *N. Biotechnol.*, vol. 30, no. 2, pp. 114–123, 2012, doi: 10.1016/j.nbt.2012.07.001.
- [51] G. A. El Shoubaky and E. A. Salem, “Terpenes and sterols composition of marine brown algae *Padina pavonica* (Dictyotales) and *Hormophysa triquetra* (Fucales),” *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 894–900, 2014.
- [52] G. Lopes *et al.*, “Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast,” *J. Phycol.*, vol. 47, no. 5, pp. 1210–1218, 2011, doi: 10.1111/j.1529-8817.2011.01028.x.
- [53] D. I. Sánchez-Machado, J. López-Hernández, P. Paseiro-Losada, and J. López-Cervantes, “An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 18, no. 3, pp. 183–190, 2004, doi: 10.1002/bmc.316.
- [54] R. T. Abdala-Díaz, A. Cabello-Pasini, E. Pérez-Rodríguez, R. M. Conde Álvarez, and F. L. Figueroa, “Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic

-
- compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta),” *Mar. Biol.*, vol. 148, no. 3, pp. 459–465, 2006, doi: 10.1007/s00227-005-0102-6.
- [55] L. Bravo, “Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance,” *Nutr. Rev.*, vol. 56, no. 11, pp. 317–333, 1998, doi: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x.
- [56] N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, “Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses,” *Food Chem.*, vol. 99, no. 1, pp. 191–203, 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
- [57] W. Vermerris and R. Nicholson, *Phenolic compound biochemistry*, Springer. Springer, 2006.
- [58] R. Randhir, Y. L. Ms, and K. Shetty, “Phenolics , their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors,” vol. 13, no. April, pp. 295–307, 2004.
- [59] K. H. Sabeena Farvin and C. Jacobsen, “Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast,” *Food Chem.*, vol. 138, no. 2–3, pp. 1670–1681, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.078.
- [60] L. Onofrejeva *et al.*, “Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 51, no. 2, pp. 464–470, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.jpba.2009.03.027.
- [61] S. H. Lee and Y. J. Jeon, “Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms,” *Fitoterapia*, vol. 86, no. 1, pp. 129–136, 2013, doi: 10.1016/j.fitote.2013.02.013.
- [62] S. U. Kadam, B. K. Tiwari, and C. P. O’Donnell, “Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 20, pp. 4667–4675, 2013, doi: 10.1021/jf400819p.
- [63] K. Ramluckan, K. G. Moodley, and F. Bux, “An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method,” *Fuel*, vol. 116, no. August, pp. 103–108, 2014, doi: 10.1016/j.fuel.2013.07.118.
- [64] E. Conde, A. Moure, and H. Dominguez, “Supercritical CO₂ extraction of fatty acids,
-

-
- phenolics and fucoxanthin from freeze-dried *Sargassum muticum*,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 27, no. 2, pp. 957–964, 2015, doi: 10.1007/s10811-014-0389-0.
- [65] A. D. P. Sánchez-Camargo *et al.*, “Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae,” *Food Chem.*, vol. 192, pp. 67–74, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.098.
- [66] J. M. Billakanti, O. J. Catchpole, T. A. Fenton, K. A. Mitchell, and A. D. Mackenzie, “Enzyme-assisted extraction of fucoxanthin and lipids containing polyunsaturated fatty acids from *Undaria pinnatifida* using dimethyl ether and ethanol,” *Process Biochem.*, vol. 48, no. 12, pp. 1999–2008, 2013, doi: 10.1016/j.procbio.2013.09.015.
- [67] *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry CHEMICAL ANALYSIS*. .
- [68] M. Herrero, A. del P. Sánchez-Camargo, A. Cifuentes, and E. Ibáñez, “Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 26–38, 2015, doi: 10.1016/j.trac.2015.01.018.
- [69] M. Zubia *et al.*, “Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts,” *Food Chem.*, vol. 116, no. 3, pp. 693–701, 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.025.
- [70] J.-K. Moon and T. Shibamoto, “Antioxidant assays for plant and food components. J Agric Food Chem,” *Bioact. Food Proteins Pept. Appl. Hum. Heal.*, vol. 57, pp. 1655–1666, 2009.
- [71] M. Paz *et al.*, “Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds,” *Food Chem.*, vol. 172, pp. 462–468, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.102.
- [72] M. F. Barroso *et al.*, “Total antioxidant capacity of plant infusions: Assessment using electrochemical DNA-based biosensor and spectrophotometric methods,” *Food Control*, vol. 68, pp. 153–161, 2016, doi: 10.1016/j.foodcont.2016.03.029.
- [73] E. Taskin, M. Ozturk, E. Taskin, and O. Kurt, “Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey),” *African J. Biotechnol.*, vol. 6, no. 24, pp. 2746–2751, Dec. 2007, doi: 10.5897/ajb2007.000-2439.
- [74] I. Robinson, G. Junqua, R. Van Coillie, and O. Thomas, “Trends in the detection of
-

-
- pharmaceutical products, and their impact and mitigation in water and wastewater in North America,” in *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Feb. 2007, vol. 387, no. 4, pp. 1143–1151, doi: 10.1007/s00216-006-0951-y.
- [75] S. Bhagavathy, P. Sumathi, and I. Jancy Sherene Bell, “Green algae *Chlorococcum humicola*- a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity,” *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 1, no. SUPPL. 1, p. S1, Sep. 2011, doi: 10.1016/S2221-1691(11)60111-1.
- [76] “*Escherichia coli*.” <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx> (accessed Mar. 18, 2021).
- [77] “*Bacillus cereus*.” <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/bacillus-cereus.aspx> (accessed Mar. 18, 2021).
- [78] C. B. Carrecelli and D. Barcelos, “Identificação de *Staphylococcus epidermidis* em formigas (Hymenoptera: Formicidae) coletadas em uma área de alimentação no município de Guarulhos, São Paulo,” *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*, vol. 84, no. 0, pp. 1–5, 2017, doi: 10.1590/1808-1657000652015.
- [79] S. Abu-Ghannam and N. Gupta, “An Assessment of the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Six Species of Edible Irish Seaweeds,” *Int. Food Res. J.*, vol. 17, pp. 205–220, 2010, doi: 10.21427/D7HC92.
- [80] A. López, M. Rico, A. Rivero, and M. Suárez de Tangil, “The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts,” *Food Chem.*, vol. 125, no. 3, pp. 1104–1109, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.09.101.
- [81] S. Connan, F. Goulard, V. Stiger, E. Deslandes, and E. A. Gall, “Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae,” *Bot. Mar.*, vol. 47, no. 5, pp. 410–416, Nov. 2004, doi: 10.1515/BOT.2004.057.
- [82] L. Montero, M. Herrero, E. Ibáñez, and A. Cifuentes, “Separation and characterization of phlorotannins from brown algae *Cystoseira abies-marina* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography,” *Electrophoresis*, vol. 35, no. 11, pp. 1644–1651, 2014, doi: 10.1002/elps.201400133.
- [83] I. G. Mekinić, D. Skroza, V. Šimat, I. Hamed, M. Čagalj, and Z. P. Perković, “Phenolic
-

-
- content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification,” *Biomolecules*, vol. 9, no. 6. MDPI AG, 2019, doi: 10.3390/biom9060244.
- [84] S. Cox, G. Hamilton Turley, G. Rajauria, N. Abu-Ghannam, and A. K. Jaiswal, “Antioxidant potential and antimicrobial efficacy of seaweed (*Himanthalia elongata*) extract in model food systems,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, no. 4, pp. 1823–1831, 2014, doi: 10.1007/s10811-013-0215-0.
- [85] K. Yonekura-Sakakibara, Y. Higashi, and R. Nakabayashi, “The Origin and Evolution of Plant Flavonoid Metabolism,” *Frontiers in Plant Science*, vol. 10. Frontiers Media S.A., p. 943, Aug. 02, 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.00943.
- [86] K. Goiris *et al.*, “Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages,” *J. Phycol.*, vol. 50, no. 3, pp. 483–492, Jun. 2014, doi: 10.1111/jpy.12180.
- [87] M. Ruslin, F. H. Akbar, A. S. Hajrah-Yusuf, and Subehan, “Analysis of total flavonoid levels in brown algae (*Sargassum* sp. and *Padina* sp.) as analgesic drug therapy,” *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, vol. 11, no. 7, pp. 81–83, Jul. 2018, doi: 10.22159/ajpcr.2018.v11i7.25657.
- [88] T. Kuda, M. Tsunekawa, H. Goto, and Y. Araki, “Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 18, no. 7, pp. 625–633, 2005, doi: 10.1016/j.jfca.2004.06.015.
- [89] N. Siriwardhana, K. W. Lee, S. H. Kim, J. W. Ha, and Y. J. Jeon, “Antioxidant Activity of *Hizikia fusiformis* on Reactive Oxygen Species Scavenging and Lipid Peroxidation Inhibition,” *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 9, no. 5, pp. 339–346, Sep. 2003, doi: 10.1177/1082013203039014.
- [90] A. Jiménez-Escrig, I. Jiménez-Jiménez, R. Pulido, and F. Saura-Calixto, “Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 81, no. 5, pp. 530–534, 2001, doi: 10.1002/jsfa.842.
- [91] Clinical and Laboratory Standards Institute, *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard - Eleventh edition*, vol. 32, no. 1. 2015.
- [92] A. Phull, A. Ali, M. Ahmed, M. Zia, I. Haq, and S. J. Kim, “In vitro antileishmanial, antibacterial, antifungal and anticancer activity of fucoidan from *Undaria pinnatifida*,”
-

-
- Int. J. Biosci.*, vol. 11, no. 4, pp. 219–227, 2017, doi: 10.12692/ijb/11.4.219-227.
- [93] J. K. Patra, S. W. Lee, J. G. Park, and K. H. Baek, “Antioxidant and Antibacterial Properties of Essential Oil Extracted from an Edible Seaweed *Undaria Pinnatifida*,” *J. Food Biochem.*, vol. 41, no. 1, 2017, doi: 10.1111/jfbc.12278.
- [94] M. Pourhajibagher, R. Ghorbanzadeh, and A. Bahador, “Antimicrobial properties of acrylic resins doped with *Undaria pinnatifida* exposed to light-emitting diode: In silico and in vitro assessments on multispecies biofilm-producing microbiota,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 27, no. May, pp. 210–215, 2019, doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.039.
- [95] F. Martelli *et al.*, “Antimicrobial and fermentation potential of *Himantalia elongata* in food applications,” *Microorganisms*, vol. 8, no. 2, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/microorganisms8020248.
- [96] S. Gupta, G. Rajauria, and N. Abu-ghannam, “Study of the microbial diversity and antimicrobial properties of Irish edible brown seaweeds,” pp. 482–489, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2621.2009.02149.x.
- [97] J. C. F. Peres, L. R. de Carvalho, E. Gonçalves, L. O. S. Berian, and J. D. Felício, “Avaliação de atividade antifúngica de extratos de macroalgas marinhas,” *Cienc. e Agrotecnologia*, vol. 36, no. 3, pp. 294–299, May 2012, doi: 10.1590/S1413-70542012000300004.
- [98] G. Rajauria, A. K. Jaiswal, N. Abu-Gannam, and S. Gupta, “Antimicrobial, antioxidant and free radical-scavenging capacity of brown seaweed *Himantalia elongata* from western coast of Ireland,” *J. Food Biochem.*, vol. 37, no. 3, pp. 322–335, Jun. 2013, doi: 10.1111/j.1745-4514.2012.00663.x.
- [99] C. Alves *et al.*, “*Bifurcaria bifurcata*: a key macro-alga as a source of bioactive compounds and functional ingredients,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 51, no. 7, pp. 1638–1646, Jul. 2016, doi: 10.1111/ijfs.13135.
- [100] A. Horta *et al.*, “Antioxidant and antimicrobial potential of the *Bifurcaria bifurcata* epiphytic bacteria,” *Mar. Drugs*, vol. 12, no. 3, pp. 1676–1689, 2014, doi: 10.3390/md12031676.
- [101] M. Puspita *et al.*, “Antioxidant and antibacterial activity of solid-liquid and enzyme-assisted extraction of phenolic compound from three species of tropical *Sargassum*,” *J.*

Phys. Conf. Ser., vol. 755, no. 1, 2016, doi: 10.1088/1742-6596/755/1/011001.

- [102] N. Boujaber, F. Lakhdar, O. A. Sidi, and M. Ben, “Antimicrobial effect of two marine algae *Gelidium sesquipedale* and *Laminaria ochroleuca* collected from the coast of El Jadida-Morocco,” *J.Bio.Innov*, vol. 5, no. 1, pp. 16–23, 2016, Accessed: Jun. 04, 2021. [Online]. Available: www.jbino.com.
- [103] P. Vinayaga Moorthi and C. Balasubramanian, “Antimicrobial properties of marine seaweed, *Sargassum muticum* against human pathogens Bio-Nanomaterials and Nanomedicine View project Antimicrobial properties of marine seaweed, *Sargassum muticum* against human pathogens,” *Artic. J. Coast. Life Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 122–125, 2015, doi: 10.12980/JCLM.3.201514J70.
- [104] A. K. Mishra, “*Sargassum*, *Gracilaria* and *Ulva* Exhibit Positive Antimicrobial Activity against Human Pathogens,” vol. 5, pp. 1–12, 2018, doi: 10.4236/oalib.1104258.
- [105] R. Freitas *et al.*, “Highlighting the biological potential of the brown seaweed *fucus spiralis* for skin applications,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 7, pp. 1–21, Jul. 2020, doi: 10.3390/antiox9070611.
- [106] J. T. Jiménez, S. O’Connell, H. Lyons, B. Bradley, and M. Hall, “Antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibition activities of acetone extract of *Ascophyllum nodosum*,” *Chem. Pap.*, vol. 64, no. 4, pp. 434–442, 2010, doi: 10.2478/s11696-010-0024-8.
- [107] H. Yunhai, A. Eyþórsdóttir, and S. M. Scully, “IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FUCOIDAN ISOLATED FROM *Ascophyllum nodosum* AND *Laminaria digitata*,” 2016.
- [108] M. O. Sofidiya, O. A. Odukoya, A. J. Afolayan, and O. B. Familoni, “Phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of *Hymenocardia acida*,” *Nat. Prod. Res.*, vol. 23, no. 2, pp. 168–177, Jan. 2009, doi: 10.1080/14786410801915838.
- [109] D. R. Joshi and N. Adhikari, “An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity,” *J. Pharm. Res. Int.*, vol. 28, no. 3, pp. 1–18, Jun. 2019, doi: 10.9734/JPRI/2019/V28I330203.
- [110] J. Alzeer and K. Abou Hadeed, “Ethanol and its Halal status in food industries,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 58, pp. 14–20, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.TIFS.2016.10.018.

Anexo

Anexo A

Macroalga *Undaria Pinnatifida*

Tabela anexo A 1 - Dados pormenorizados da macroalga *Undaria Pinnatifida*.

<i>E. coli</i>				NCTC 9001		
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	23,64
AcO	6,13	4,68	6,79	5,87	0,18	20,42
AcEt	NI	NI	NI	-	-	18,84
Hex	NI	NI	NI	-	-	17,49
CHI	NI	NI	NI	-	-	26,28
<i>S. epidermidis</i>				NCTC11047		
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	17,74
AcO	NI	NI	NI	-	-	15,24
AcEt	NI	NI	NI	-	-	22,32
Hex	NI	NI	NI	-	-	15,85
CHI	NI	NI	NI	-	-	16,37
<i>B. cereus</i>				ATCC14579		
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	7,04	3,95	NI	5,49	2,19	17,41
AcO	7,09	6,27	3,86	5,74	1,68	19,32
AcEt	NI	NI	NI	-	-	16,82
Hex	8,17	4,63	2,76	5,19	2,75	17,26
CHI	5,96	6,92	4,34	5,74	1,30	16,66
<i>S. aureus</i>				ATCC25923		
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	17,32
AcO	NI	NI	NI	-	-	25,62
AcEt	10,05	9,25	9,95	9,75	0,44	23,05
Hex	NI	NI	NI	-	-	23,43
CHI	NI	NI	NI	-	-	24,46
<i>S. enteritidis</i>				ATCC13676		
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	7,66	6,80	7,55	7,34	0,06	21,13
AcO	11,17	8,39	8,95	9,51	0,15	18,49
AcEt	12,02	11,60	NI	11,81	0,03	21,17
Hex	5,36	4,98	5,28	5,21	0,04	21,38
CHI	8,44	9,28	9,60	9,11	0,07	20,58

Tabela anexo A 1 - Dados pormenorizados da macroalga *Undaria Pinnatifida*.

	<i>P. aeruginosa</i>			ATCC 10145		
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	17,14
AcO	NI	NI	NI	-	-	17,24
AcEt	NI	NI	NI	-	-	18,47
Hex	NI	NI	NI	-	-	18,50
CHI	NI	NI	NI	-	-	18,12

Macroalga *Himanthalia elongata*

Tabela anexo A 2 - Dados pormenorizados da macroalga *Himanthalia elongata*.

	<i>E. coli</i>					
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	21,31
AcO	NI	NI	NI	-	-	22,45
AcEt	6,57	5,98	NI	6,28	0,07	20,09
Hex	NI	NI	NI	-	-	18,14
CHI	7,67	7,36	NI	7,52	0,03	21,61
	<i>S. epidermidis</i>					
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	9,18	9,45	8,19	8,94	0,07	23,37
AcO	NI	NI	NI	-	-	14,11
AcEt	NI	NI	NI	-	-	19,61
Hex	NI	NI	NI	-	-	20,53
CHI	NI	NI	NI	-	-	14,08
	<i>B. cereus</i>					
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	5,25	5,20	8,14	6,20	1,68	20,71
AcO	6,80	6,74	5,54	6,36	0,71	15,94
AcEt	6,46	6,16	7,52	6,71	0,11	18,76
Hex	NI	NI	NI	-	-	15,44
CHI	NI	NI	NI	-	-	16,66
	<i>S. aureus</i>					
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	18,44
AcO	NI	NI	NI	-	-	20,20
AcEt	NI	NI	NI	-	-	20,32
Hex	NI	NI	NI	-	-	19,00
CHI	NI	NI	NI	-	-	18,00

Tabela anexo A 2 - Dados pormenorizados da macroalga *Himanthalia elongata*.

<i>S. enteritidis</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	4,57	3,87	8,50	5,65	0,44	18,89
AcO	11,11	11,25	12,64	11,67	0,07	18,08
AcEt	11,23	9,62	NI	10,42	0,11	16,31
Hex	NI	NI	NI	-	-	17,22
CHI	7,11	7,76	NI	7,44	0,06	25,87
<i>P. aeruginosa</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	6,08	6,77	NI	6,42	0,08	19,86
AcO	NI	NI	NI	-	-	21,55
AcEt	6,65	7,47	NI	7,06	0,08	19,72
Hex	NI	NI	NI	-	-	20,71
CHI	NI	NI	NI	-	-	20,12

Macroalga *Pelvetia canaliculata*

Tabela anexo A 3 - Dados pormenorizados da macroalga *Pelvetia canaliculata*.

<i>E. coli</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	24,80
AcO	NI	NI	NI	-	-	20,26
AcEt	NI	NI	NI	-	-	18,86
Hex	NI	NI	NI	-	-	30,90
CHI	NI	NI	NI	-	-	21,53
<i>S. epidermidis</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	18,33
AcO	NI	NI	NI	-	-	18,33
AcEt	10,97	9,09	12,47	10,84	0,16	17,09
Hex	NI	NI	NI	-	-	18,33
CHI	NI	NI	NI	-	-	18,04
<i>B. cereus</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	6,04	7,57	7,55	7,05	0,88	19,03
AcO	NI	NI	NI	-	-	17,04
AcEt	NI	NI	NI	-	-	17,19
Hex	NI	NI	NI	-	-	15,37
CHI	NI	NI	NI	-	-	15,92

Tabela anexo A 3 - Dados pormenorizados da macroalga *Pelvetia canaliculata*.

<i>S. aureus</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	21,54
AcO	NI	NI	NI	-	-	19,53
AcEt	NI	NI	NI	-	-	20,99
Hex	NI	NI	NI	-	-	18,90
CHI	NI	NI	NI	-	-	20,29
<i>S. enteritidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	8,86	9,62	8,95	9,14	0,05	13,05
AcO	9,51	8,76	11,92	10,06	0,16	24,29
AcEt	NI	NI	NI	-	-	17,93
Hex	NI	NI	NI	-	-	19,88
CHI	3,96	4,91	NI	4,43	0,15	18,95
<i>P. aeruginosa</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	13,25	15,80	10,00	13,01	0,22	22,50
AcO	NI	NI	NI	-	-	16,01
AcEt	NI	NI	NI	-	-	20,10
Hex	NI	NI	NI	-	-	17,41
CHI	NI	NI	NI	-	-	22,81

Macroalga *Saccharina latissima*

Tabela anexo A 4 - Dados pormenorizados da macroalga *Saccharina latissima*.

<i>E. coli</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	13,77	14,39	NI	14,08	0,03	16,82
AcO	17,60	10,64	NI	14,12	0,35	11,08
AcEt	NI	NI	NI	-	-	14,70
Hex	NI	NI	NI	-	-	16,09
CHI	11,99	13,32	NI	12,65	0,07	18,09
<i>S. epidermidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	20,74
AcO	12,92	13,90	NI	13,41	0,05	19,61
AcEt	9,02	4,94	NI	6,98	0,41	21,19
Hex	NI	NI	NI	-	-	22,48
CHI	NI	NI	NI	-	-	22,84

Tabela anexo A 4 - Dados pormenorizados da macroalga *Saccharina latissima*.

<i>B. cereus</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	controlo mm
EtOH	12,05	11,83	11,62	11,83	0,02	19,76
AcO	8,65	6,54	7,48	7,56	0,14	11,05
AcEt	9,42	7,47	7,97	8,28	0,12	15,04
Hex	7,64	7,72	7,20	7,52	0,04	14,90
CHI	NI	NI	NI	-	-	11,98
<i>S. aureus</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	controlo mm
EtOH	13,72	11,10	17,06	13,96	0,21	16,48
AcO	NI	NI	NI	-	-	19,88
AcEt	13,98	8,23	10,74	10,98	0,26	13,78
Hex	11,08	8,48	NI	9,78	0,19	15,48
CHI	10,78	9,46	13,14	11,13	0,17	13,18
<i>S. enteritidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	17,15
AcO	15,60	15,17	NI	15,38	0,02	19,27
AcEt	NI	NI	NI	-	-	19,75
Hex	NI	NI	NI	-	-	22,11
CHI	NI	NI	NI	-	-	13,30
<i>P. aeruginosa</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	controlo mm
EtOH	11,03	10,87	13,58	11,83	0,13	20,34
AcO	12,17	12,35	11,49	12,00	0,04	17,71
AcEt	8,35	15,62	NI	11,98	0,43	24,25
Hex	9,85	11,19	11,94	10,99	0,10	16,79
CHI	12,80	8,30	NI	10,55	0,30	19,69

Macroalga *Bifurcaria bifurcata*

Tabela anexo A 5 - Dados pormenorizados da macroalga *Bifurcaria bifurcata*.

<i>E. coli</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	15,75
AcO	NI	NI	NI	-	-	18,36
AcEt	NI	NI	NI	-	-	22,52
Hex	NI	NI	NI	-	-	16,94
CHI	NI	NI	NI	-	-	16,27
<i>S. epidermidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	13,75	11,58	13,83	13,05	0,10	18,74
AcO	20,65	21,91	12,63	18,39	0,27	19,11
AcEt	17,64	16,05	15,95	16,55	0,06	16,63
Hex	18,09	19,65	16,93	18,22	0,07	18,20
CHI	12,21	21,39	15,73	16,44	0,28	13,73
<i>B. cereus</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	17,77	14,57	13,73	15,35	0,14	22,61
AcO	23,70	23,20	NI	23,45	0,01	18,43
AcEt	14,33	14,35	17,44	15,37	0,12	20,51
Hex	9,51	10,42	15,78	11,90	0,28	19,69
CHI	15,64	13,07	12,33	13,68	0,13	20,63
<i>S. aureus</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	15,35	12,79	22,07	16,74	0,29	29,50
AcO	13,91	11,70	NI	12,81	0,12	18,15
AcEt	11,70	12,89	17,78	14,12	0,23	21,85
Hex	8,68	10,37	12,76	10,60	0,19	19,67
CH	10,03	15,53	9,64	11,73	0,28	17,76
<i>S. enteritidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	18,51	16,39	19,52	18,14	0,09	22,34
AcO	20,11	21,20	21,20	20,84	0,03	21,05
AcEt	15,81	15,98	18,85	16,88	0,10	24,79
Hex	16,96	17,77	17,13	17,28	0,02	22,39
CHI	10,77	14,52	11,13	12,14	0,17	24,12
<i>P. aeruginosa</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	10,44	10,51	10,35	10,43	0,01	19,03
AcO	19,02	20,64	21,20	20,29	0,06	20,54
AcEt	11,69	10,92	11,97	11,53	0,05	20,20
Hex	11,29	9,71	9,10	10,03	0,11	17,90
CHI	13,44	10,66	11,12	11,74	0,13	16,55

Macroalga *Laminaria ochroleuca*

Tabela anexo A 6 - Dados pormenorizados da macroalga *Laminaria ochroleuca*.

<i>E. coli</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	18,59
AcO	NI	NI	NI	-	-	14,75
AcEt	NI	NI	NI	-	-	16,25
Hex	NI	NI	NI	-	-	16,04
CHI	13,40	16,78	8,10	12,76	0,34	18,65
<i>S. epidermidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	17,78
AcO	10,22	8,06	6,32	8,20	0,24	17,98
AcEt	NI	NI	NI	-	-	19,31
Hex	NI	NI	NI	-	-	19,84
CHI	NI	NI	NI	-	-	19,37
<i>B. cereus</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	11,37	9,58	7,76	9,57	0,19	18,73
AcO	6,57	5,66	5,61	5,95	0,09	11,73
AcEt	8,37	7,38	6,68	7,48	0,11	14,60
Hex	NI	NI	NI	-	-	8,72
CHI	8,86	9,01	7,97	8,61	0,07	18,05
<i>S. aureus</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	9,24	10,11	10,48	9,94	0,06	14,38
AcO	9,59	11,40	9,82	10,27	0,10	15,74
AcEt	9,87	10,07	10,77	10,24	0,05	15,15
Hex	NI	NI	NI	-	-	13,13
CHI	13,34	8,05	10,52	10,64	0,25	13,77
<i>S. enteritidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	9,68	8,17	NI	8,93	0,12	18,25
AcO	NI	NI	NI	-	-	17,78
AcEt	NI	NI	NI	-	-	19,66
Hex	NI	NI	NI	-	-	19,46
CHI	11,49	10,01	NI	10,75	0,10	18,21
<i>P. aeruginosa</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	8,74	8,47	10,15	9,12	0,10	21,63
AcO	9,52	13,10	11,86	11,49	0,16	14,10
AcEt	11,92	10,62	12,12	11,55	0,07	13,96
Hex	4,14	4,92	NI	4,53	0,12	14,25
CHI	8,32	6,91	10,07	8,43	0,19	16,72

Macroalga *Sargassum muticum*

Tabela anexo A 7 - Dados pormenorizados da macroalga *Sargassum muticum*.

<i>E. coli</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	16,50
AcO	NI	NI	NI	-	-	16,14
AcEt	NI	NI	NI	-	-	12,90
Hex	NI	NI	NI	-	-	18,56
CHI	NI	NI	NI	-	-	21,59
<i>S. epidermidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	11,42	9,12	8,67	9,73	0,15	19,85
AcO	NI	NI	NI	-	-	18,43
AcEt	8,54	9,07	10,06	9,22	0,08	11,23
Hex	NI	NI	NI	-	-	17,67
CHI	NI	NI	NI	-	-	21,93
<i>B. cereus</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	4,87	9,61	6,18	6,89	0,36	10,60
AcO	10,26	11,99	9,01	10,42	0,14	15,41
AcEt	8,64	9,37	7,60	8,53	0,10	15,76
Hex	6,03	6,08	3,94	5,35	0,23	13,97
CHI	8,28	9,66	9,62	9,19	0,09	17,01
<i>S. aureus</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	5,90	6,68	6,51	6,36	0,06	12,93
AcO	NI	NI	NI	-	-	23,02
AcEt	7,84	9,96	NI	8,90	0,17	21,65
Hex	NI	NI	NI	-	-	18,03
CHI	6,81	5,23	5,25	5,76	0,16	12,38
<i>S. enteritidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	18,59
AcO	NI	NI	NI	-	-	19,40
AcEt	NI	NI	NI	-	-	13,31
Hex	NI	NI	NI	-	-	20,93
CHI	12,10	7,32	NI	9,71	0,35	22,55
<i>P. aeruginosa</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	8,38	9,64	9,17	9,06	0,07	19,43
AcO	5,05	7,69	10,92	7,89	0,37	19,25
AcEt	12,84	8,49	14,34	11,89	0,26	17,61
Hex	8,20	10,03	8,59	8,94	0,11	19,65
CHI	9,97	10,98	7,22	9,39	0,21	13,08

Macroalga *Fucus spiralis*

Tabela anexo A 8 - Dados pormenorizados da macroalga *Fucus spirali* .

<i>E. coli</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	14,40
AcO	NI	NI	NI	-	-	16,44
AcEt	NI	NI	NI	-	-	14,12
Hex	NI	NI	NI	-	-	16,88
CHI	8,75	8,26	8,78	8,60	0,03	17,89
<i>S. epidermidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	10,41
AcO	NI	NI	NI	-	-	
AcEt	12,15	12,00	13,56	12,57	0,07	12,29
Hex	4,25	7,82	NI	6,04	0,42	8,19
CHI	NI	NI	NI	-	-	
<i>B. cereus</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	16,07
AcO	11,96	2,76	7,13	7,28	0,63	17,92
AcEt	NI	NI	NI	-	-	15,69
Hex	NI	NI	NI	-	-	14,42
CHI	NI	NI	NI	-	-	19,37
<i>S. aureus</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	15,94
AcO	11,66	9,10	NI	10,38	0,17	20,57
AcEt	NI	NI	NI	-	-	14,91
Hex	NI	NI	NI	-	-	20,87
CHI	NI	NI	NI	-	-	14,23
<i>S. enteritidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	14,33
AcO	16,07	14,37	10,02	13,49	0,23	18,60
AcEt	NI	NI	NI	-	-	24,23
Hex	NI	NI	NI	-	-	20,07
CHI	NI	NI	NI	-	-	11,79
<i>P. aeruginosa</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	16,35
AcO	NI	NI	NI	-	-	21,13
AcEt	NI	NI	NI	-	-	13,70
Hex	NI	NI	NI	-	-	23,10
CHI	NI	NI	NI	-	-	17,15

Macroalga *Ascophyllus nodosum*

Tabela anexo A 9 - Dados pormenorizados da macroalga *Ascophyllus nodosum*.

<i>E. coli</i>						
Solventes	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	15,71	15,70	21,91	17,77	0,20	18,82
AcO	NI	NI	NI	-	-	17,69
AcEt	NI	NI	NI	-	-	21,18
Hex	NI	NI	NI	-	-	17,02
CHI	NI	NI	NI	-	-	15,70
<i>S. epidermidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	11,28	14,54	19,08	14,97	0,26	15,88
AcO	15,33	12,40	11,47	13,07	0,15	13,44
AcEt	9,97	13,24	18,33	13,85	0,30	11,04
Hex	NI	NI	NI	-	-	15,16
CHI	NI	NI	NI	-	-	7,27
<i>B. cereus</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	14,51
AcO	13,94	22,45	18,34	18,24	0,23	20,69
AcEt	NI	NI	NI	-	-	19,84
Hex	11,38	10,19	NI	10,79	0,08	16,35
CHI	NI	NI	NI	-	-	20,34
<i>S. aureus</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	14,38	12,72	13,81	13,63	0,06	19,09
AcO	NI	NI	NI	-	-	17,34
AcEt	NI	NI	NI	-	-	14,32
Hex	NI	NI	NI	-	-	19,07
CHI	NI	NI	NI	-	-	21,27
<i>S. enteritidis</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	11,09	7,78	10,27	9,71	0,18	18,79
AcO	NI	NI	NI	-	-	20,18
AcEt	NI	NI	NI	-	-	15,02
Hex	NI	NI	NI	-	-	17,95
CHI	6,66	9,87	8,36	8,30	0,19	15,21
<i>P. aeruginosa</i>						
	Inibição mm			Média	Desvio Padrão	Controlo mm
EtOH	NI	NI	NI	-	-	18,81
AcO	13,86	14,53	17,45	15,28	0,13	17,86
AcEt	NI	NI	NI	-	-	17,43
Hex	NI	NI	NI	-	-	23,23
CHI	NI	NI	NI	-	-	19,63